

**Tarcísio Liberato de Souza Júnior**

**PROTEÔMICA APLICADA AO ESTUDO DO PROCESSAMENTO N-  
TERMINAL PROTEICO NO SECRETOMA DE CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Instituto de Ciência e Tecnologia, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

**São José dos Campos**

**2018**

**Tarcísio Liberato de Souza Júnior**

**PROTEÔMICA APLICADA AO ESTUDO DO PROCESSAMENTO N-  
TERMINAL PROTEICO NO SECRETOMA DE CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Instituto de Ciência e Tecnologia, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:**

Dr. André Zelanis Palitot Pereira

**São José dos Campos**

**2018**

Liberato de Souza Júnior, Tarcísio

**Proteômica aplicada ao estudo do processamento N-terminal proteico no secretoma de células tumorais/**

Tarcísio Liberato de Souza Júnior. – São José dos Campos, 2018.

XX, 122f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Instituto de Ciência e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Proteomics applied to the study of N-terminal protein processing in tumoral cells**

1. Proteômica. 2. N-terminômica. 3. Melanoma. 4. Câncer

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Eduardo Antonelli

Coordenador do curso de pós-graduação: Profa. Dra. Cláudia Barbosa Ladeira de Campos

**Tarcísio Liberato de Souza Júnior**

**PROTEÔMICA APLICADA AO ESTUDO DO PROCESSAMENTO N-TERMINAL  
PROTEICO NO SECRETOMA DE CÉLULAS TUMORAIS**

Presidente da banca:

Prof. Dr. André Zelanis Palitot Pereira \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

*“Aos meus pais pelo exemplo de vida e amor incondicional, sempre me encorajando frente aos obstáculos da vida. À minha querida irmã Cristiane e irmãos Felipe e Fernando, por todo amor que nos une a cada dia. Amo todos vocês!”*

## AGRADECIMENTOS

**Antes de mais nada**, agradeço a meu amigo e orientador Dr. André Zelanis Palitot Pereira, por sua dedicação a este projeto, e o empenho ao meu processo de doutoramento. Não tenho como expressar a minha gratidão quanto a sua generosidade, convivência, afeição quanto à idealização desse projeto, bem como suas orientações singulares. A sua dedicação ao ensino e a pesquisa são notórias, motivadoras, que me inspira a crescer como profissional, e a continuar no caminho da ciência. Desejo a você André, que toda orientação e conhecimento a mim passado, seja revertido em sucesso na sua carreira. Muito Obrigado!

Gostaria de agradecer ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Paulo e todos os seus membros constituintes.

Agradeço a todos os pesquisadores que colaboraram para o desenvolvimento deste estudo, em especial à professora Dra. Dayane Batista Tada, do Laboratório de Desenvolvimento de nanopartículas da UNIFESP, ao Dr. Martin Rodrigo Alejandro Wurtele Alfonso do Laboratório de Bioquímica e Biologia Estrutural da UNIFESP, à Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, ao Dr. Alexandre Keiji Tashima, do Laboratório de Proteômica da UNIFESP-SP, ao professor Dr. Oliver Schilling, do Instituto de Medicina e Biologia Molecular da Universidade de Freiburg, Alemanha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro que tornou viável o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio ao projeto ... nº 2014/06579-3

Gostaria de agradecer ao Dr. Eduardo Shigueo Kitano, à M.Sc Débora Andrade e a Dra. Milene Menezes.

Agradeço em especial os meus amigos e colegas de laboratório, Msc. Dayelle Pessotti, Isabella Fukushima, Francine Fontes, Maurício Camacho, Rafael Berton,

Msc. Daniela Formaggio, Msc. Thaís Dolzany, por toda parceria, companheirismo. Esse trabalho não teria sido concretizado sem a presença de cada um de vocês, muito obrigado!

Aos meus pais, à minha irmã Cristiane, Felipe, Nando, Samantha, Mimim e Heleninha.

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho ao longo desses anos.

Obrigado a todos!



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	MELANOMA .....	21
1.2	PROTEÍNAS SECRETADAS (SECRETOMA) .....	24
1.3	ANÁLISE SISTÊMICA DA EXTREMIDADE N-TERMINAL DE PROTEÍNAS:.....	27
1.3.1	N-terminômica .....	27
1.3.2	Acetilação do N-Terminal .....	29
1.3.3	Formação de Piroglutamato (glutamato e glutamina N-terminal)....	30
1.3.4	Formilação .....	31
1.3.5	Propionilação .....	31
1.3.6	Miristoilação e Palmitoilação .....	32
1.3.7	Mono-metilação, Di-metilação e Tri-metilação .....	32
1.3.8	N-degrons .....	33
1.4	PROTEASES, PROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO E CÂNCER .....	34
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	OBJETIVO GERAL .....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	40
3.1	LINHAGENS CELULARES .....	40
3.2	AMOSTRAS DE PACIENTES.....	42
3.3	CULTIVO CELULAR .....	46
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES .....	46
3.4.1	Curva de Crescimento.....	46
3.4.2	Efeito do carenciamento na proliferação celular .....	47
3.4.3	Tempo de aderência em cultura.....	47
3.4.4	Viabilidade (exclusão do corante azul de tripan).....	48
3.5	COLETA DO SECRETOMA .....	48
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	49
3.7	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA .....	49
3.8	ZIMOGRAFIA .....	49
3.9	PREPARO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM MELANOMA .....	50
3.9.1	Desparafinização dos tecidos tumorais.....	51

3.9.2 Microdissecação.....	51
3.10 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	51
3.10.1 Extração de proteínas das amostras de pacientes com melanoma e análise proteômica (shotgun) .....	51
3.10.2 Análise proteômica (shotgun) dos secretomas celulares.....	52
3.10.3 Seleção negativa e enriquecimento de N-terminais proteicos por sulfonação dos peptídeos internos.....	54
3.10.4 TAILS - Seleção negativa e enriquecimento de N-terminais proteicos utilizando dendrímero de aldeídos.....	56
3.11 PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	60
3.11.1 Análise proteômica quantitativa.....	60
3.11.2 Análise N-terminômica e anotação funcional .....	61
3.11.2.1 Identificação e quantificação .....	61
3.11.2.2. Anotação funcional/posicional .....	62
3.12 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA .....	63
3.12.1 Normalização dos dados e análise pareada (teste-t).....	63
3.12.2 Soft clustering, enriquecimento de categorias do Gene Ontology (GO) e heatmaps .....	64
4 RESULTADOS .....	65
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	65
4.2 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA NOS SECRETOMAS CELULARES .....	66
4.3 PERFIL ELETROFORÉTICO DOS SECRETOMAS EM GEL DE SDS- POLIACRILAMIDA .....	66
4.4 ZIMOGRAFIA .....	67
4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA (SHOTGUN) DOS SECRETOMAS CELULARES.....	68
4.5.1 Identificações proteicas e correlação entre as replicatas biológicas	68
4.5.2 Expressão diferencial - análise proteômica quantitativa entre as linhagens celulares.....	71
4.5.3 Assinaturas de expressão proteica nos secretomas das linhagens celulares – soft clustering e anotação funcional.....	75
4.6 ANÁLISE DO N-TERMINOMA DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO SECRETOMAS CELULARES.....	78
4.6.1 Identificações proteicas/ peptídicas e modificações químicas N-terminais .....	78
4.6.2 Perfil comparativo do processamento N-terminal entre nos secretomas das linhagens celulares .....	81

4.6.3 Anotação posicional dos N-terminais identificados nos secretomas das linhagens tumorais.....	82
4.7 ANÁLISE N-TERMINÔMICA (TAILS) DOS SECRETOMAS CELULARES DAS LINHAGENS PAREADAS MURINAS (MELANA E TM1).....	86
4.7.1 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS INTERNOS.....	88
4.7.1.2 Análise de possíveis sítios de clivagem nos peptídeos N-terminais identificados no secretoma das linhagens murinas .....	88
4.7.2 Ativação e processamento de fatores de crescimento.....	90
4.7.3 Processamento de proteínas de matriz extracelular (Colágenos) ...	91
4.7.3.1 “Shedding” de domínios ectópicos .....	92
4.8 ANÁLISE PROTEÔMICA DAS AMOSTRAS DE PACIENTES.....	93
4.8.1 Identificações proteicas e correlação entre as análises.....	93
4.8.2 Análise da expressão de proteínas .....	94
4.8.3 Peptídeos comuns entre todas as células tumorais.....	95
5 DISCUSSÃO .....	97
5.1 AVALIAÇÃO DOS SECRETOMAS DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS ...	97
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SECRETOMAS E ASSINATURAS DE EXPRESSÃO PROTEICA .....	98
5.3 PADRÕES DE PROCESSAMENTO E MODIFICAÇÕES NO N-TERMINAL .....	101
5.3.1 LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS .....	101
5.3.2 PADRÕES DE PROCESSAMENTO E MODIFICAÇÕES NO N-TERMINAL DAS LINHAGENS MURINAS.....	102
5.4 PADRÕES DE EXPRESSÃO PROTEICA NAS AMOSTRAS DE PACIENTES.....	104
6 CONCLUSÕES.....	106
REFERENCIAS .....	107
ANEXO 1 - CALCULOS DAS CURVAS DE CRESCIMENTO.....	123
ANEXO 2 – CURVAS DE CRESCIMENTO.....	124
ANEXO 3 - MATERIAL SUPLEMENTAR .....	125
ANEXO - 4 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF PROTEOMICS.....	126
ANEXO - 5 – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO .....	127

## Lista de Figuras

Figura 1 – a- Desenho esquemático do melanócito..	21
Figura 2 - Estágios de crescimento vertical do melanoma.	23
Figura 3 - Tipos de modificações químicas no N-terminal e os correspondentes incrementos de massa observados.	29
Figura 4 - O processamento proteolítico	36
Figura 5 - Estratégia experimental conduzida nesse trabalho.	40
Figura 6 – Cortes histológicos de 12 pacientes por tipo de Melanoma.	45
Figura 7 - Procedimento de desparafinização das amostras de tecidos de pacientes fixadas em parafina.	50
Figura 8 - Enriquecimento de N-Terminais por Reversão de Carga.	54
Figura 9 - Representação esquemática para o enriquecimento de N-Terminais por meio de polímero.	57
Figura 10 - Fluxo de trabalho esquemático da análise dos espectros de MS/MS.	62
Figura 11 - Perfil eletroforético dos secretomas.	67
Figura 12 – Avaliação da atividade proteolítica por zimografia .	68
Figura 13 - Número de proteínas identificadas na análise comparativa dos secretomas celulares.	69
Figura 14 - Reprodutibilidade da quantificação proteica entre replicatas biológicas .	70
Figura 15 - Proteínas secretadas diferencialmente expressas nos secretomas analisados.	71
Figura 16 – Redes de interação proteína-proteína nos secretomas dos fibroblastos Hs 895 Sk e Hs 895 T.	73
Figura 17 - Redes de interação proteína-proteína nos secretomas das linhagens A375 e SH-4.	74
Figura 18- <i>Clusterização</i> das proteínas compartilhadas entre as replicatas biológicas de todas as linhagens celulares.	76
Figura 19 - Assinaturas de expressão proteica relacionadas aos secretomas das 4 linhagens de estudo.	77

Figura 20 – Perfil de identificação de peptídeos/proteínas nos secretomas celulares após procedimento TAILS. ....	78
Figura 21 – Modificações químicas presentes no N-terminal .....	80
Figura 22 - Análise comparativa dos peptídeos identificadas após o procedimento TAILS .....	81
Figura 23 - Eventos de processamento proteolítico identificados nos secretomas das linhagens tumorais.. ....	85
Figura 24 - Análise comparativa entre os N-terminais das linhagens murinas Melan-a e Tm1. ....	87
Figura 25 - IceLogo representando os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de clivagem dos peptídeos identificados. ....	89
Figura 26 - Análise do processamento de fatores de crescimento identificados no secretoma da linhagem Tm1. ....	90
Figura 27 - Análise do processamento de proteínas de matriz extraceular (Colágenos). ....	91
Figura 28 - Identificação de peptídeos de domínio extracelular correspondentes à proteínas de membrana. ....	92
Figura 29 – Reprodutibilidade da quantificação proteica entre as amostras de pacientes. ....	93
Figura 30 – <i>Heatmap</i> para proteínas diferencialmente expressas. ....	94
Figura 31 - Peptídeos comuns identificadas nas linhagens tumorais humanas e amostras de pacientes .....	95
Figura 32 - Curvas de Crescimento das linhagens em estudo .....	124

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classes terapêuticas seletivas aplicadas no tratamento do melanoma. ...	24
<b>Tabela 2</b> - Marcadores imuno-histoquímicos protenciais que podem ser úteis na distinção entre Nevo e Melanoma. ....	26
<b>Tabela 3</b> – Técnicas de enriquecimento de N-terminal proteico por seleção positiva e negativa.....	37
<b>Tabela 4</b> - Características das linhagens celulares utilizadas neste estudo .....	41
<b>Tabela 5</b> - Características das tecidos de pacientes utilizados neste estudo .....	43
<b>Tabela 6</b> - Marcação isotópica dos peptídeos e combinação comparativa .....	53
<b>Tabela 7</b> - Marcação isotópica dos peptídeos e combinação comparativa.....	55
<b>Tabela 8</b> - Caracterização das linhagens em estudo. ....	65
<b>Tabela 9</b> - Concentração proteica nos secretomas celulares .....	66
<b>Tabela 10</b> - Anotação posicional dos peptídeos obtidos pela análise de TAILS dos secretomas celulares (Hs 895T, SH-4 e A375). ....	82
<b>Tabela 11</b> - Peptídeos Identificados em todas as amostras tumorais (12 Pacientes e linhagens Hs. 895T, A375, SH4) .....	95

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AZD6244	Selumetinibe
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
CD26	Dipeptidil peptidase-4
CD40	<i>Cluster of Differentiation 40</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
COFRADIC	<i>Combined Fractional Diagonal Chromatography</i>
DICAS	<i>Dimethyl Isotope- Coded Affinity Selection</i>
E3 $\alpha$	Ubiquitina Ligase E3 $\alpha$
E2	Ubiquitina Ligase E2
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FLIP	<i>FLICE-like inhibitor protein</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed, Paraffin-embedded</i>
GSK2118436	Inibidor da quinase Raf
GADD	<i>The Growth Arrest and DNA Damage</i>
HDM2	<i>Human Double Minute 2</i>
HeLa	Linhagem celular HeLa
HsNMT1/2	Isoformas 1 e 2 de N- miristoil transferase

INCA	Instituto Nacional de Câncer
KI-67	Antígeno KI-67
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MLN8054	Inibidor de aurora quinase
MCP-1/2	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1 and 2</i>
Nt2/d1	Linhagem celular de carcinoma embrionário humano pluripotente
N-CLAP	<i>Chemical labeling of the Alpha Amine of Proteins</i>
PLX-4032	Vemurafenibe (PLX-4032)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
P16	Proteína supressora de tumor
P21	Inibidora de quinase dependente de ciclina
P53	Gene supressor de tumor
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
pGLU	Ácido piroglutâmico
RAF	Quinase específica para Ser/Thr
RAS	<i>Rat Sarcoma</i> (Oncogene RAS)
R05068760	Inibidor de MEK 1 e 2
SCF-RING	<i>Multi-protein E3 Ubiquitin Ligase Complex</i>
SKP2	<i>S-phase Kinase-associated Protein 2</i>
SNS-314	Inibidor de Aurora quinase
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>



S100A6	<i>S100 calcium-binding protein A6</i>
TAILS	<i>Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates</i>
TK6	Linhagem celular de linfoblastóide B humana
TRK-A	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TRIPLE-WT	<i>Triple Wild Type</i>
UVA	Ultra Violet A
UVB	Ultra Violet B
VX680	Inibidor de aurora quinase
XL281	Inibidor de quinase Raf

## Resumo

**Objetivo:** Identificar de forma sistêmica, possíveis marcadores moleculares associados a processos proteolíticos em melanoma. Analisar qualitativamente e quantitativamente o secretoma de células tumorais de melanoma e amostras de pacientes, bem como identificar as principais modificações pós-traducionais presentes no N-terminal das proteínas secretadas e correlacionar os resultados obtidos com possíveis processamentos proteolíticos de proteases específicas e associar os resultados com possíveis vias biológicas envolvidas no processo tumorigênico.

**Métodos:** Realizamos uma análise proteômica dos secretomas derivados de quatro linhagens celulares humanas: (i) um conjunto pareado de fibroblastos – Hs 895. T, uma linhagem celular obtida de um local metastático pulmonar de um paciente com melanoma e Hs 895. Sk, uma linhagem celular de fibroblastos da pele (derivada do mesmo paciente); (ii) duas linhagens malignas de melanoma – A375, uma linhagem de célula maligna de melanoma de fonte primária, e SH4, uma linhagem celular derivada de uma paciente com melanoma metastático pleural. Avaliamos por meio de espectrometria de massas peptídeos N-terminais dos secretomas das linhagens humanas (Hs 895 Sk, Hs 895 T, A375 e SH4) e uma linhagem pareada de melanócitos murinos, normais e tumorais (Melan-a e Tm1, respectivamente), bem como tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina de 12 pacientes com melanoma.

**Resultados:** Análises dos perfis de expressão e do enriquecimento funcional de proteínas presentes no secretoma das linhagens celulares humanas revelaram a presença de padrões de co-expressão de grupos proteicos funcionalmente correlatos em cada tipo celular. A análise de redes de interações proteína-proteína demonstrou a existência de grupos cuja interação contribui e apresenta implicações no desenvolvimento e progressão tumoral. A análise N-terminômica (TAILS) permitiu identificar modificações co-traducionais, tais como N-terminais acetilados, bem como eventos proteolíticos em ambos os secretomas de melanócitos murinos (normal e tumoral). O mapeamento dos sítios de clivagem no secretoma tumoral sugeriu a participação de proteases ativas em importantes processos biológicos relacionados à oncogênese, como o processamento de fatores de crescimento, clivagem de proteínas da matriz extracelular (MEC) e *shedding* de domínios ectópicos da

superfície celular. Os padrões de processamento proteolítico verificados nos secretomas das linhagens celulares de melanoma tiveram sobreposição com aqueles observados nas amostras de tecido de pacientes com melanoma em diferentes estádios, revelando possíveis candidatos a marcadores relacionados ao melanoma.

**Conclusões:** Os padrões e assinaturas proteicas podem ser resultados de perfis de expressão proteica específicas das células em estudo, que podem servir como base para análises posteriores do proteoma de secretomas de melanoma. Os peptídeos processados e conservados nas amostras tumorais de pacientes com melanoma, podem possibilitar a investigação futura de possíveis biomarcadores para o diagnóstico de melanoma. Nossos resultados revelam uma camada adicional de complexidade na biologia da oncogênese, que surge não apenas pelo perfil de mutações genéticas e / ou expressão alterada de proteínas, mas também por meio de mecanismos pós-traducionais como o processamento proteolítico.

## ABSTRACT

**Objective:** To identify biological markers associated to proteolytic processes in melanoma. To perform qualitative and quantitative analysis of the secretome of tumoral cells and patient samples, as well as to identify the main post-translational modifications at the N-terminus of secreted protein, correlating the results with proteolytic processing events in the light of biological pathways related to oncogenesis.

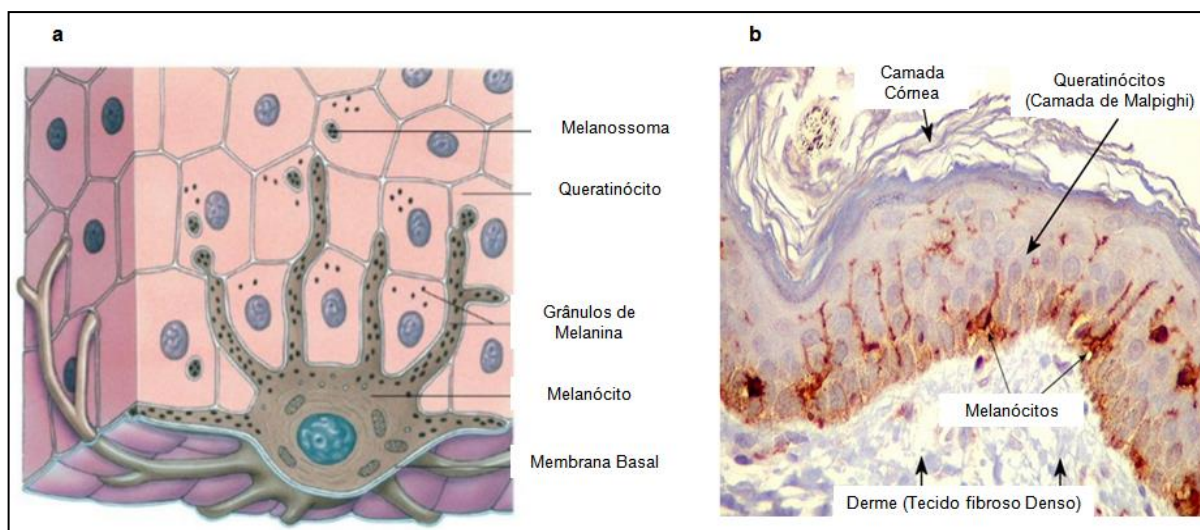
**Methods:** We performed a proteomic analysis of secreted proteins from four human cell lines: (i) a paired set of fibroblasts - Hs 895. T, a cell line obtained from a lung metastatic site from a patient who had with melanoma and Hs 895. Sk, a cell line of skin fibroblasts (derived from the same patient); (ii) two malignant melanoma lines - A375, a malignant melanoma cell of primary source lineage, and SH4, a cell line derived from a patient with pleural metastatic melanoma. Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates (TAILS) analysis was performed on human cell lines (Hs 895 Sk, Hs 895 T, A375 and SH4) and upon a paired set of cell lines comprising normal and tumoral murine melanocytes (Melan-a and Tm1, respectively) Proteomic analysis was also performed on human samples using , formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from 12 patients with melanoma. **Results:** Analysis of expression profiles and functional enrichment of proteins present in the secretoma of human cell lines revealed the presence of co-expression patterns of functionally correlated protein groups in each cell type. The analysis of protein-protein interaction networks demonstrated the existence of groups whose interaction contributes and has implications for tumor development and progression. N-terminomic (TAILS) analysis allowed the profiling of co-translational modifications such as acetylated N-termini as well as proteolytic events in both murine melanocytes secretomes (normal and tumoral). The mapping of cleavage sites in the tumoral secretome suggested functional roles of active proteases in important biological processes related to oncogenesis, such as processing growth factors, cleaving extracellular matrix (ECM) proteins and shedding of ectopic domains from the cell surface. The proteolytic processing patterns found in the secretomes of melanoma cell lines displayed some degree of overlapping with those observed in tissue samples from melanoma patients, revealing possible melanoma-related markers. **Conclusions:** The proteome landscape of melanoma secretomes comprised

signatures of protein expression as a result of specific expression profiles of the cells under study, which may serve as a basis for further analysis of melanoma secretomes and patient samples. The identification of proteolytic peptides processed and conserved in tumor samples from patients with melanoma may enable future investigation of possible biomarkers for the diagnosis and prognosis of melanoma. In addition, our results reveal an additional layer of complexity in the biology of oncogenesis, which emerges not only by the landscape of genetic mutations and/or altered protein expression but also by means of post-translational mechanisms such as proteolytic processing.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Melanoma

Melanoma é a neoplasia que se origina a partir dos melanócitos, células pigmentadas produtoras de melanina, presentes em quase todos os organismos vivos (Figura 1a). Os melanócitos situam-se principalmente entre as células da camada basal da epiderme, e seus prolongamentos insinuam-se entre os queratinócitos, nos quais secretam a melanina que produzem (Figura 1b). Nos seres humanos, os melanócitos são encontrados em diferentes localizações do corpo, como a pele, olhos, intestino, membrana epitelial do ouvido interno e as leptomeninges, que podem ser acometidas por esta neoplasia, embora, o melanoma cutâneo seja a forma predominante da doença (1). É considerada a forma mais mortal de câncer de pele, atingindo milhares de pessoas a cada ano ao redor do mundo e com o número de casos aumentando mais rapidamente do que o de outros tipos de tumores sólidos (2,3).



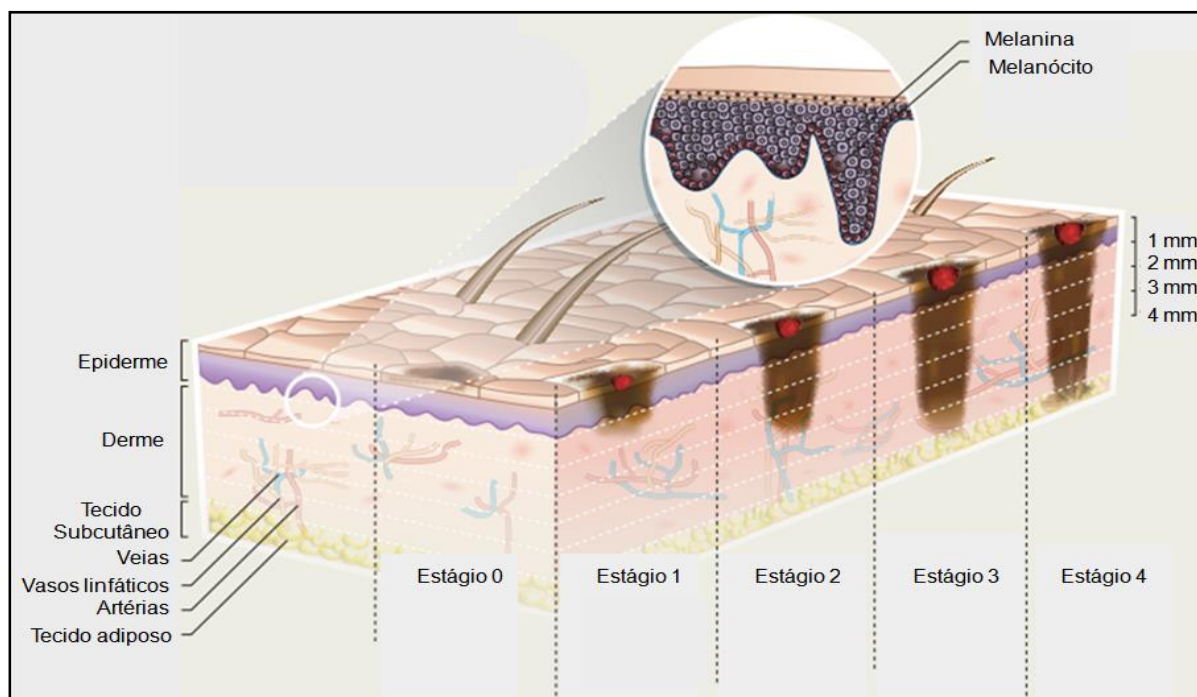
**Figura 1** – a- Desenho esquemático do melanócito. Fonte: Adaptado de (4) b- Os melanócitos situam-se entre as células da camada basal da epiderme. Os corpos celulares de alguns melanócitos são vistos em posição mais alta, na camada de Malpighi. Fonte: Adaptado de (5).

Os melanócitos presentes na epiderme variam quantitativamente segundo a região anatômica, a cabeça e antebraços são as regiões mais densas desse tipo celular, e a exposição à radiação solar um fator importante na indução da proliferação dos melanócitos, o que pode ser observado em indivíduos expostos à radiação

ultravioleta - UV (6). Os melanócitos neoplásicos apresentam intensa atividade mitótica, proliferação descontrolada, irregularidade morfológica, núcleos de tamanho aumentado, distribuindo-se em grupos celulares (7).

O desenvolvimento do melanoma está associado a diferentes fatores etiológicos, como o número aumentado de nevos atípicos, histórico familiar e queimaduras decorrentes da exposição constante da pele aos raios ultravioleta – UVA e UVB, acarretando em danos ao código genético (3,8). Nos últimos anos, a incidência do melanoma cutâneo primário vem apresentando aumento estável e preocupante; segundo a “*American Cancer Society*” (9), estima-se que 87.110 novos casos de melanoma serão diagnosticados nos Estados Unidos no ano de 2017. Em populações caucasianas, trata-se do segundo tipo de câncer com disseminação mais rápida e, embora se trate de neoplasia com bom prognóstico quando diagnosticada precocemente, está associada com uma das mais altas taxas de mortalidade em casos avançados, devido à capacidade do desenvolvimento de metástases (10). A alta incidência ocorre em regiões onde os habitantes são predominantemente de pele clara, como na América do Norte, norte europeu, Austrália e Nova Zelândia. A incidência de melanoma na América do Sul e na Ásia é relativamente baixa (3). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer - INCA, 5.679 casos foram registrados no Brasil no ano de 2016, com o acometimento de 3.000 homens e 2.670 mulheres (11). O melanoma acontece com frequência discretamente maior no sexo feminino, afetando predominante adultos de meia idade com menor acometimento de crianças (12).

De acordo com Breslow (13) o prognóstico do melanoma está diretamente relacionado à profundidade de crescimento do tumor, medida em milímetros de espessura, a partir da camada granulosa da pele. O índice de Breslow é um importante fator de prognóstico do melanoma (12). Em estágios mais avançados, a proliferação pode formar nódulos expansivos e infiltrar em camadas mais profundas da pele, como a derme e a hipoderme (14). O melanoma pode ser representado numericamente, quanto ao seu estágio de desenvolvimento, correspondendo à profundidade de crescimento vertical na pele (Figura 2).



Fonte: Adaptado de (3)

**Figura 2** - Estágios de crescimento vertical do melanoma. Estágio 0 – Nesse estágio inicial as células do melanoma ainda estão confinadas na epiderme, a camada mais externa da pele. Estágio 1 – Nessa fase o tumor pode ser facilmente removido por excisão cirúrgica. Estágio 2 – Espessura de no máximo 4 mm e não há sinais de espalhamento para nódulos linfáticos proximais. Nesse estágio de desenvolvimento o melanoma também pode ser removido por procedimento cirúrgico. Estágio 3 – As células tumorais já se espalharam para camadas mais profundas da pele, atingindo vasos linfáticos ou glândulas linfáticas. Nesse estágio, mais da metade dos casos de melanoma acabam voltando após a remoção por cirurgia. Estágio 4 – Nesse estágio avançado do melanoma, o câncer pode já ter atingido outras partes do corpo, como pulmão, fígado, cérebro, nódulos linfáticos distantes ou outras áreas da pele.

O diagnóstico realizado no início do desenvolvimento da doença é o objetivo principal na prevenção de eventos secundários, como a metástase. O bom prognóstico em melanomas superficiais possui taxas de cura que se aproximam de 100% nos melanomas *in situ*. Desta forma, existe uma necessidade latente da identificação de marcadores de câncer com alta sensibilidade e especificidade para detecção precoce da doença (15).

Muitas características clínicas, histopatológicas e genéticas estão fortemente associadas com o desenvolvimento de metástases e pobre prognóstico (16–18). Akbane *et al.*, (19), descreveram as alterações genômicas em melanomas cutâneos por meio da análise de melanomas primários e metastáticos de 331 pacientes. Estes autores estabeleceram uma estrutura para a classificação genômica do melanoma em quatro subtipos, com base no padrão de genes mutantes mais prevalentes: *BRAF* (*B-*



*Raf proto-oncogene*), *RAS (N/H/K)*, *NF1 (Neurofibromin)* e “*triple-WT*” (*Wild type*), que não possui mutações nesses genes especificamente. Um dos sucessos mais significantes na prática clínica tem sido o desenvolvimento de alvos terapêuticos para pacientes com mutações específicas (20,21). De acordo com Evans *et al.* (22) a inibição direcionada das principais vias de proliferação celular, sobrevivência, angiogênese, invasão ou metástase, deve ser realizada para o tratamento efetivo do melanoma, bem como a prevenção do crescimento tumoral. Diferentes classes terapêuticas direcionadas à alvos específicos são abordadas na clínica atualmente (Tabela 1).

**Tabela 1** - Classes terapêuticas seletivas aplicadas no tratamento do melanoma.

Alvo Terapêutico	Medicamento	Especificidade da medicação
Inibidores RAF	PLX-4032 (Vemurafenibe)	Seletivo para <sup>V600E</sup> B-Raf <sup>1</sup>
	Sorafenibe	Inibidor de B-Raf
	XL281	Seletivo para <sup>V600E</sup> B-Raf
	GSK2118436	
Inibidores MEK 1/2	AZD6244	Inibidores das vias MEK/ERK <sup>2</sup>
	R05068760	
Inibidores de Aurora-Quinase	SNS-314	Inibidores da fosforilação de serina 10 de Aurora-Quinase
	VX680	
	MLN8054	

<sup>1</sup>V600E B-Raf – Mutação específica no gene *BRAF*.

<sup>2</sup>MEK/ERK – Quinase ativadora de MAP quinase.

Fonte: Adaptado de (22)

## 1.2 Proteínas secretadas (secretoma)

Uma característica comum entre as células eucarióticas é o endereçamento de proteínas do interior das células para a região extracelular, por meio do reconhecimento de uma sequência N-terminal, denominada como peptídeo sinal, contudo, proteínas funcionalmente ativas, sem peptídeo sinal, têm sido descritas no meio extracelular (23–26). As proteínas secretadas possuem papel fundamental na comunicação intercelular, bem como em importantes processos fisiológicos na defesa imune, coagulação sanguínea, remodelação de matriz extracelular e também na progressão de tumores (17,27–29).

Nesse contexto, o secretoma de células tumorais é uma fonte promissora de possíveis biomarcadores, uma vez que as proteínas secretadas são mais propensas a perfundir na circulação sanguínea (28). A busca por biomarcadores de câncer, ou ainda, por marcadores de um prognóstico maligno, consiste num dos campos em que se concentra uma grande quantidade de recursos humanos e, sobretudo, financeiros, tanto da iniciativa privada (empresas farmacêuticas e de biotecnologia) quanto da pesquisa pública em todo o mundo (30–33). A multiciplidade de fatores associados à tumorigênese ou responsáveis pelo desenvolvimento deste processo, torna difícil elencar uma ou algumas proteínas como marcadores exclusivos do processo tumoral (30). Além disso, o câncer é um processo de etiologia altamente heterogênea e, conseqüentemente, sua complexidade é subjacente ao fenótipo tumoral, apresentando diversas implicações no entendimento da progressão e terapêutica dos casos (34,35). Embora de fundamental importância na pesquisa oncológica, a análise de tecidos ou amostras tumorais obtidas por microdissecção não permite a detecção de proteínas secretadas ou liberadas no ambiente extracelular, características importantes para o entendimento da complexidade celular e molecular do microambiente tumoral. As células do estroma tumoral muitas vezes são recrutadas pelas células tumorais a participarem do processo tumorigênico e contribuírem para o desenvolvimento deste, tanto por meio da indução da produção e liberação de sinais moleculares responsáveis pela progressão tumoral, como fatores de crescimento celular, quanto pela facilitação da dispersão de células tumorais por meio da atividade de proteases que degradam a matriz extracelular (34,35). Neste processo, a secreção de moléculas específicas por parte das células tumorais torna-se uma estratégia de grande eficácia para mediação dos eventos de sinalização celular, contribuindo direta ou indiretamente para o desenvolvimento e proliferação das células cancerosas (34). O desequilíbrio na homeostasia celular decorrente do processo tumoral tem um importante reflexo na síntese proteica e, conseqüentemente, no repertório de proteínas secretadas por células malignas em relação às células normais (29,36). Segundo Pardo *et al.* (37), cerca de 133 proteínas presentes no secretoma de linhagens celulares de melanoma também foram reportadas em secretomas de outros tipos de câncer.

A utilização de metodologias de aquisição e análise de dados em larga escala permite avaliações qualitativas e quantitativas essencialmente impossíveis de serem

realizadas por meio de abordagens bioquímicas tradicionais. Desta forma foi possível, por exemplo, comprovar a existência de vias secretórias não-canônicas em células tumorais, responsáveis pela secreção de proteínas cuja presença no secretoma era, há muito tempo, considerada contaminação com proteínas oriundas do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura celular (36).

A caracterização de biomarcadores proteicos, se torna necessária não apenas para diagnosticar precocemente o melanoma, mas também para avaliar o estadiamento da neoplasia, selecionar e monitorar a evolução do tratamento, bem como o prognóstico (38). Estudos proteômicos que envolvem a investigação em larga escala das proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, visam compreender os eventos da progressão tumoral e têm sido o foco de diferentes grupos (39). Potenciais marcadores imuno-histoquímicos têm sido descritos como úteis para a diferenciação entre melanoma e Nevo, uma tipo de lesão benigna na pele (Tabela 2).

**Tabela 2** - Marcadores imuno-histoquímicos protenciais que podem ser úteis na distinção entre Nevo e Melanoma.

<b>Marcador</b>	<b>Descrição</b>
PTEN	Molécula de sinalização celular/ Atua na supressão tumoral
Trk-A	Supressor de tumor envolvido na via da quinase fosfatidilinositol-3 sendo o principal antagonista do fosfoinosítídeo 3 quinase.
Bcl-2	Marcadores antiapoptose/ Envolvidas no ciclo celular
Cdk2	
Ciclina A	
Ciclina B	
Ciclina D3	
GADD <sup>1</sup>	Marcadores antiapoptose/ Envolvidas no ciclo celular
HDM2	
P16	
P21	

P53 Proteína Retinoblastoma	
Skp2	
Antígenos de células germinativas masculina	Marcador imuno modulatório
CD26	Marcador imuno modulatório/ receptor de adenosina deaminase
CD40	Marcador imuno modulatório de células B/ Supressor de tumor
FLIP	Marcador imuno modulatório
Ki-67	Marcador de proliferação
PCNA <sup>2</sup>	Marcador de proliferação
S100A6	Membro da família de proteína S100

<sup>1</sup>GADD – *Growth Arrest DNA Damage*.

<sup>2</sup>PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*.

Fonte: Adaptado de (40)

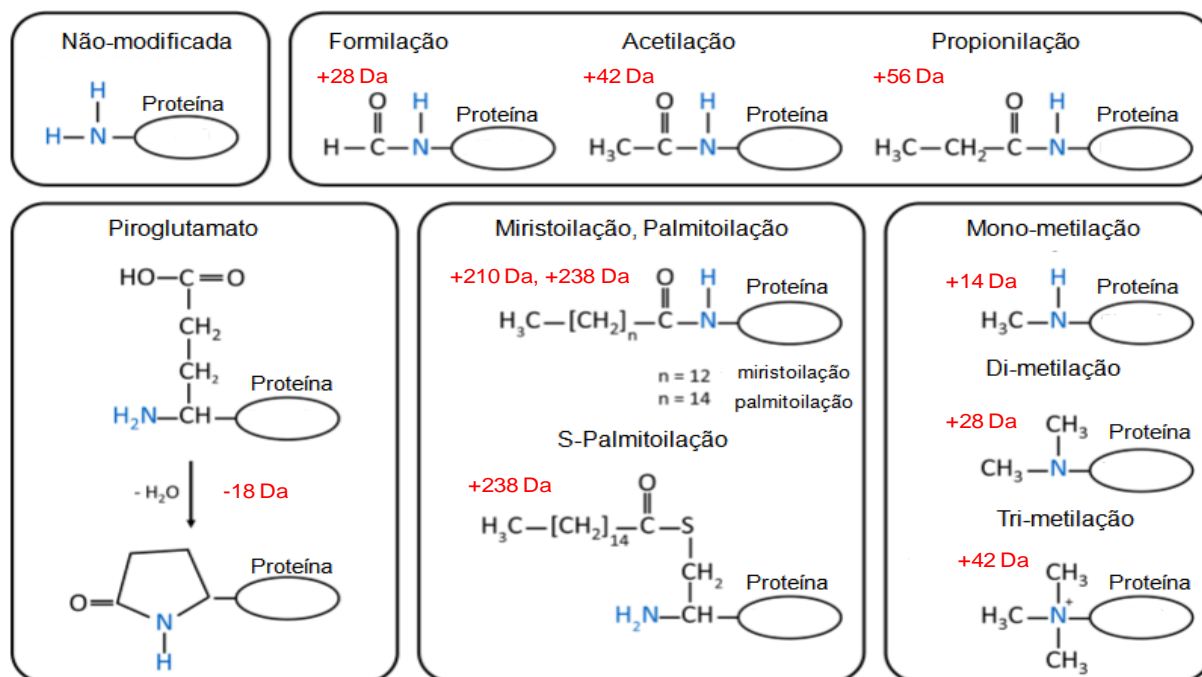
Recentes avanços na análise proteômica de tecidos, fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE), abriram a possibilidade de estudar vastos arquivos de material clínico e registros médicos associados (39). Nesse contexto, a proteômica contribui para uma visão mais abrangente de sistemas biológicos sobretudo no que diz respeito a diversidade e abundância de proteínas, possibilitando a identificação de assinaturas proteicas em processos fisiopatológicos específicos.

### 1.3 Análise sistêmica da extremidade N-terminal de proteínas:

#### 1.3.1 N-terminômica

A vida de todas as proteínas se inicia pela extremidade amino-terminal, também conhecida como N-terminal proteico (41). Em eucariotos, no início do

processo de tradução do RNA mensageiro (mRNA), os primeiros aminoácidos a serem adicionados à cadeia polipeptídica são os primeiros a deixarem os ribossomos no citosol ou no retículo endoplasmático (41). A extremidade N-terminal de proteínas, bem como as modificações pós- traducionais sofridas pelo  $\alpha$ -amino grupo ou cadeia lateral do resíduo N-terminal tem diversas implicações na manutenção da homeostasia de diversos processos biológicos tais como localização celular, atividade e *turnover* da maioria das proteínas (41–43). A investigação sistêmica da extremidade N-terminal de proteínas recebeu recentemente a denominação de *N-terminomics* (N-terminoma) e tem sido fortemente impulsionada pela utilização de plataformas analíticas de alta robustez e processividade, como a espectrometria de massas (44–46). Neste sentido, metodologias recentes de análise sistêmica do N-terminal de proteínas têm sido reportadas e o grande êxito destas estratégias tem sido alcançado por (1) enriquecer seletivamente as amostras com N-terminais (naturais ou gerados por processamento proteolítico) e (2) diminuir drasticamente o *dynamic range* das amostras, isto é, permitir que proteínas de baixa abundância sejam identificadas mesmo em amostras complexas, cuja concentração das mais diversas proteínas presentes varia em diversas ordens de grandeza (45). Estas estratégias tem permitido a identificação e quantificação simultânea da diversidade de proteínas presentes, bem como de suas modificações N-terminais no contexto biológico estudado. Segundo Tooley *et al.* (47), animais *knockout* para N-metiltransferase exibem defeitos no reparo do DNA, tamanho reduzido, infertilidade, degeneração hepática e morte prematura. A correlação da abundância de espécies N-terminais incompletos (truncados) com a progressão do mal de Alzheimer, com o aumento significativo de proteínas que apresentam ciclização N-terminal ácido piroglutâmico, em peptídeos  $\beta$ -amilóides que apresentam alterações nos três primeiros resíduos, foi observado por Drew *et al.* (48). Atualmente, existe um número conhecido de modificações químicas no N-terminal que controlam a funcionalidade de proteínas ou polipetídeos, incluindo acetilação, mono-metilação, di-metilação e tri-metilação, formilação, carbamilação, succinilação, ciclização, propionilação, palmitoilação e miristoilação (Figura 3).



Fonte: Adaptado de (49).

**Figura 3** - Tipos de modificações químicas no N-terminal e os correspondentes incrementos de massa observados.

### 1.3.2 Acetilação do N-Terminal

A acetilação da extremidade N-terminal é um exemplo de evento ubíquo de modificação estrutural de proteínas eucarióticas e com importantes implicações funcionais, tais como a contribuição para a estabilidade proteica, o envolvimento na criação de *N-degrons* e a inibição do endereçamento proteico a organelas celulares específicas (50–52). A desregulação da acetilação da extremidade N-terminal tem sido associada a vários tipos de câncer e progressão de doenças (52,53). Utilizando lisados proteicos provenientes de diferentes organismos, de bactérias a linhagens celulares humanas, Helbig *et al.* (54) realizaram um estudo proteômico sistêmico da acetilação de N-terminais em proteínas e verificaram importantes características estruturais, compartilhadas entre os N-terminais analisados. Conforme relatado pelos autores, em proteínas humanas a presença de resíduos de alanina na segunda posição da extremidade N-terminal tem um papel importante na acetilação deste resíduo quando a metionina inicial é removida. Uma vez identificadas sequências-consenso para os N- terminais provenientes de diferentes organismos, é possível correlacionar os resultados com a atividade de

enzimas específicas, responsáveis por este tipo de modificação (*N*-acetil-transferases), inferir hipóteses acerca da conservação filogenética deste mecanismo nos mais diferentes seres vivos, bem como suas implicações funcionais e evolutivas.

### **1.3.3 Formação de Piroglutamato (glutamato e glutamina N-terminal)**

Muitas proteínas e peptídeos biologicamente ativos possuem um resíduo de ácido piroglutâmico (pGlu) na extremidade N-terminal. Esta modificação pós-traducional origina-se a partir da conversão dos resíduos de glutamina e glutamato N-terminais em ácido piroglutâmico, catalisada pela ação da enzima glutaminil ciclase ou isoglutaminil ciclase. A formação do ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal influencia a estabilidade estrutural bem como a atividade biológica de proteínas e polipeptídeos (55). Estudos tem mostrado que pGlu protege as proteínas da degradação por aminopeptidases, bem como a regulação da atividade biológica de hormônios, neuropeptídeos e quimiocinas (56). Exemplos incluem a liberação de hormônios tireotrofina (TRH), liberação do hormônio gonadotrofina e quimiocinas humanas MCP-1 e 2. A presença de pGlu no N-terminal em muitos peptídeos amiloidogênicos, como os peptídeos beta-amilóide, aumenta a hidrofobicidade, resultando em uma agregação acelerada (57). A inibição da glutaminil ciclase é considerada uma estratégia promissora para aumentar a degradação de peptídeos inflamatórios e neurotóxicos. A inibição da glutaminil ciclase diminui a resposta inflamatória de fígado por desestabilizar a quimiocina MCP1(CCL2) (58). A degradação proteolítica da MCP1 pela inibição da glutaminil ciclase também tem sido proposta como uma nova estratégia na prevenção de metástases em câncer da tireoide (59).

#### 1.3.4 Formilação

Análises das modificações pós traducionais em histonas e outras proteínas reguladoras da conformação da cromatina, revelaram múltiplos sítios de acetilação, metilação, fosforilação e formilação (60). A formilação pode afetar resíduos de lisina de histonas, importantes na interação com o DNA, interferindo com a estabilização de locais de ligação de fatores de transcrição e reguladores da cromatina (60). Jiang *et al.* (61) demonstrou que a formilação em lisinas pode ocorrer pelo dano oxidativo do DNA. Eles mostraram que a 3'formilfosfato gerado pela oxidação da desoxirribose reage com resíduos de lisina. Segundo o mesmo autor, a frequência de formilação em lisinas, presentes em cromatinas de cultura celular de TK6, é de aproximadamente 0,1%, entretanto, nas histonas esse percentual pode ser maior, devido a proximidade das histonas com o DNA, que são diretamente afetadas por essas modificações.

#### 1.3.5 Propionilação

A propionilação de proteínas ocorre tanto em eucariotos como em procariotos. Okanishi *et al.* (62) identificou 362 sítios de propionilação em 183 proteínas de bactérias *Thermus thermophiles*. Segundo Sum *et al.* (63) a propionilação está relacionada com o metabolismo de carboidratos em bactérias, porém, a importância dinâmica do papel da propionilação na fisiologia de bactérias ainda continua desconhecido. Em humanos, a propionilação de proteínas foi observada após análise de N-terminais proteicos de células Nt2/d1 e HeLa, sugerindo a existência de uma enzima capaz de propionilar o  $\alpha$ -amino-grupo das proteínas (64,65). Foyn *et al.* (66) verificou pela primeira vez que as acetiltransferases podem também catalizar a propionilação do N-terminal e a despropionilação de histonas internas pode ser catalizada por histona-desacetilases. Um estudo realizado por Nie *et al.* (67) mostrou que 30% de 170 histonas identificadas em fígado de rato, com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, apresentaram em resíduos de lisina, modificações como



propionilação, butirilação, malonilação e succinilação, sugerindo possíveis papéis dessas modificações no desenvolvimento de diabetes e obesidade.

### **1.3.6 Miristoilação e Palmitoilação**

A *N*-miristoilação é uma ligação irreversível de um ácido graxo de cadeia alquílica contendo 14 carbonos (C14) à glicina N-terminal, catalizada por *N*-miristoiltransferase (68,69). Thinon *et al.* (70) revelou que, embora a maioria das *N*-miristoilações ocorram co-translacionalmente, esse tipo de modificação pode surgir durante a apoptose (morte celular programada), após a clivagem de proteínas por caspases, revelando um novo N-terminal glicínico. Segundo Frearson *et al.* (71) a *N*-miristoilação demonstrou ser importante para a viabilidade e sobrevivência de muitos organismos, como plantas e parasitas, sendo um alvo terapêutico em potencial, contra infecções fúngicas. Em humanos, os homólogos de *N*-meristoiltransferases (HsNMT1 e HsNMT2), são potenciais alvos quimioterápicos em câncer e transtornos auto-imunes, pelo envolvimento com vários tipos de câncer (72,73).

A S-acilação de proteínas é uma modificação pós-traducional reversível, que envolve a ligação de um ácido graxo (palmitato) a resíduos de cisteína, sendo a denominação palmitoilação, mais comumente utilizada (74). A palmitoilação modula diferentes processos, como o processamento maturacional das proteínas, ancoragem de membrana, sinalização, degradação e regulação imune (75,76). Os processos de palmitoilação e depalmitoilação são catalizados por aciltransferases e por tioesterases (77).

### **1.3.7 Mono-metilação, Di-metilação e Tri-metilação**

As metiltransferases, que catalizam a metilação de diferentes proteínas, como a histona, desempenham papel crucial em diversos processos biológicos e progressão de doenças (78). Em particular, as metiltransferases foram reconhecidas como principais atores na regulação da expressão gênica e do estado da cromatina

(79). A metilação de histonas é uma das modificações mais estudadas, uma vez que está intrinsicamente implicada na formação e manutenção da heterocromatina, na regulação transcricional, no reparo do DNA, na inativação do cromossomo X e na maturação do RNA (80).

### 1.3.8 N-degrons

Os resíduos N-terminais têm um forte impacto na estabilidade e meia-vida das proteínas. Descrito primeiramente em 1986 por Bachmair e colaboradores (81), o controle da degradação de proteínas em eucariotos e bactérias é governado pela formação e reconhecimento de sequências específicas na extremidade N-terminal da proteína, conhecida como *N-degrons*. O fator determinante para um *N-degron* é um resíduo desestabilizador no N-terminal. Em eucariotos, duas vias de regra são bem estabelecidas: a acetilação dos resíduos na extremidade N-terminal bem como o resíduo arginina no N-terminal (82). O processamento proteolítico resulta em alterações estruturais que levam a criação de sinais de degradação específicos (*N-degrons*) que dirigem as proteínas para o sistema ubiquitina - proteassoma (83).

Proteínas com resíduos, designados como destabilizadores, como a arginina ou a leucina, são reconhecidas pela E3 $\alpha$  (ligase de ubiquitina-proteína) ou N-recognina que juntamente com uma E2 específica (enzimas conjugadoras de ubiquitina) medeiam a poli-ubiquitilação da proteína que é, então, rapidamente degradada pelo proteassoma. Regiões de proteínas ricas em prolina, glutamato, serina e treonina, quando expostas à superfície de uma proteína são também muitas vezes reconhecidas como sinais de destruição pela via proteolítica dependente de ubiquitina. A fosforilação do resíduo de serina ou de treonina nestas regiões parece mediar o reconhecimento da proteína por certas ligases do tipo SCF-RING. Outras proteínas apresentam uma sequência de 9 resíduos, próximo do N-terminal que é reconhecida por certas ligases.

## 1.4 Proteases, processamento proteolítico e câncer

Proteases são enzimas cuja atividade está presente em diversos processos fisiológicos, tais como: ovulação e fertilização, desenvolvimento embrionário, formação de ossos, remodelagem tecidual e cicatrização, inflamação, angiogênese, apoptose, entre outros (84,85). A diversidade funcional destas enzimas está intrinsecamente relacionada com a presença de domínios adicionais (além do catalítico) na estrutura da proteína madura. Por este motivo, um entendimento da complexidade e dinamismo dos eventos proteolíticos requer a identificação do repertório de substratos utilizados por uma determinada protease, ou o “degradoma” da protease (46).

Mantidas algumas proporções, o microambiente tumoral apresenta semelhanças com a resposta inflamatória decorrente de um processo de reparação tecidual, no qual eventos como a angiogênese e a degradação da matriz extracelular garantem a manutenção e mobilidade das células tumorais, respectivamente (86,87). A participação de proteases no microambiente tumoral é uma condição imprescindível para o desenvolvimento do processo tumorigênico, uma vez que participam de diversas etapas dos principais eventos de progressão tumoral como, por exemplo, invasão tecidual, angiogênese, regulação da inflamação, manutenção do nicho metastático (35,88,89). Neste contexto, embora o microambiente tumoral apresente uma complexidade inerente à diversidade funcional das células presentes, os eventos de sinalização proteolítica podem ser investigados a partir da análise dos sítios de clivagem presentes nas proteínas (intra ou extra) celulares dos tecidos tumorais ou culturas celulares. Esta afirmativa decorre do fato de que os eventos de sinalização molecular disparados por proteases são *irreversíveis*: o sinal molecular é transmitido por meio da clivagem da(s) proteína(s)-alvo(s) que, em última instância, pode resultar na ativação, ou inativação da função desta e/ou de outras proteínas numa cascata de eventos biológicos (85). Desta forma, a identificação dos sítios de processamento proteolítico, bem como a anotação funcional do degradoma de proteases em contextos sistêmicos é de extrema importância na formulação de hipóteses acerca do papel biológico desempenhado por estas enzimas, bem como

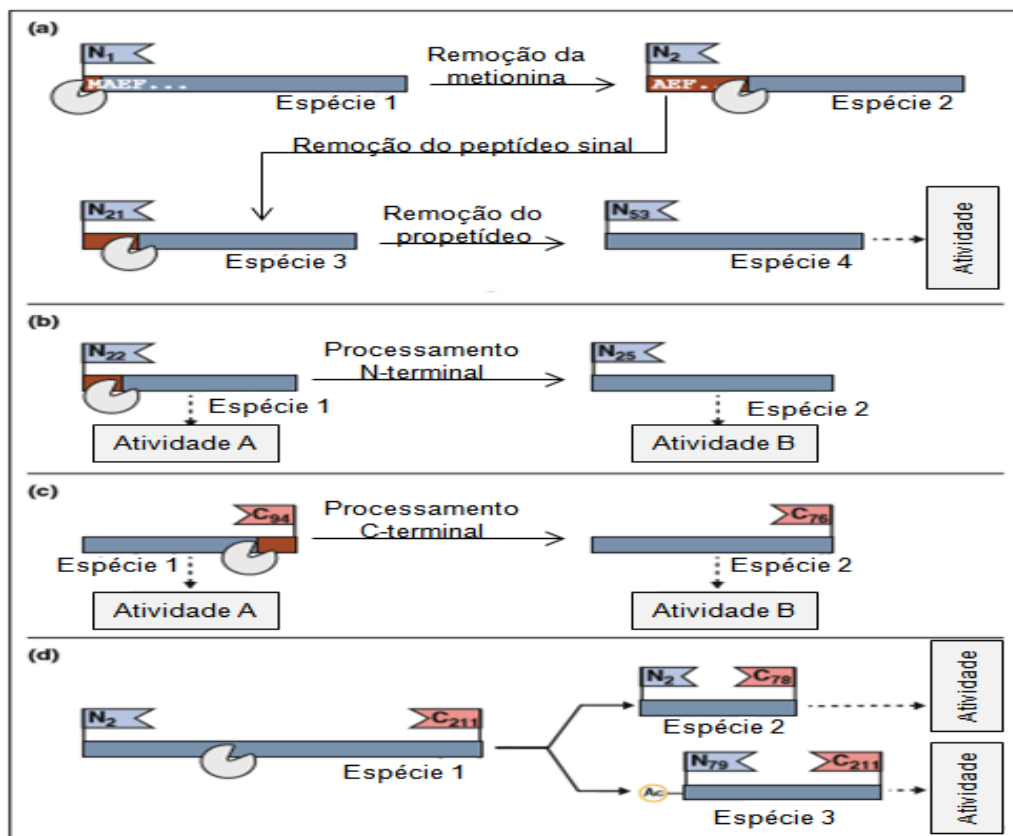
no descobrimento de marcadores para o diagnóstico de doenças e estudos de eficácia de novos fármacos.

Grande parte das abordagens experimentais voltadas para o estudo de secretomas de células tumorais tem enfoque principal na diversidade de proteínas identificadas, no intuito de encontrar proteínas específicas (biomarcadores), padrões de expressão característicos (assinaturas) ou ainda, marcadores de progressão tumoral. Contudo, pouca atenção tem sido dada às modificações presentes no N-terminal das proteínas secretadas. Esta observação torna-se importante na medida em que, muito embora a expressão relativa de uma proteína permaneça inalterada, suas características estruturais, particularmente o seu processamento pós-traducional, pode apresentar expressiva alteração durante o processo tumoral (90,91).

A análise de novos N-terminais, gerados por processamento proteolítico e presentes no meio condicionado de culturas celulares, permite a correlação com a atividade de proteases expressas por células tumorais. Em análise do secretoma de células tumorais derivadas de adenocarcinoma mamário humano, Laurent-Matha *et al.* (92) verificaram que o aumento da atividade proteolítica da cisteíno-protease cathepsina D tem estreita correlação com a hidrólise do inibidor canônico de cisteíno-proteases cistatina-C, modulando positivamente a cascata de eventos proteolíticos decorrentes da progressão tumoral.

Peptídeos derivados de processamento proteolítico e presentes em fluidos biológicos podem ainda ser utilizados como marcadores de prognóstico maligno. O estudo dos eventos de clivagem é particularmente útil para a identificação de substratos proteolíticos (82). Chang *et al.* (93) verificaram a presença de um fragmento oriundo de processamento proteolítico do domínio globular terminal tipo-laminina da proteína endorepelinina no meio condicionado de células derivadas de carcinoma mamário. Utilizando uma abordagem direcionada de espectrometria de massas (*Selected Reaction Monitoring* – SRM) os autores detectaram a presença deste fragmento processado no plasma de pacientes com câncer de mama e sugeriram a utilização deste método para auxiliar a detecção precoce dos casos de câncer de mama.

De uma forma geral, a análise comparativa do N-terminoma presente no contexto sistêmico (representado pelo meio condicionado de culturas celulares tumorais e não tumorais) é indissociável da análise do sítio de processamento proteolítico e, conseqüentemente, do degradoma de proteases ativas durante o processo tumoral. Esta característica representa uma grande vantagem no que diz respeito à diversidade e riqueza de informações adquiridas por meio da análise proteômica de N-terminais. Dentre as diversas modificações sofridas por uma proteína após sua síntese, a proteólise limitada, também conhecida como processamento proteolítico propicia uma separação física que resulta na geração de novas “espécies” proteicas (Figura 4), com efeitos significativos em diversos processos biológicos, sobretudo na sinalização celular (90).



Fonte: Adaptado de (90).

**Figura 4** - O processamento proteolítico é responsável pela geração de diferentes “espécies” proteicas. (a) Maturação sequencial. Aminoácidos únicos ou peptídeos são removidos da estrutura principal da proteína por exopeptidases ou endopeptidases, respectivamente. Um dos fragmentos sofre degradação sem exercer atividade intermediária resultando em conversão sequencial de uma espécie de proteína em outra. (b) Remoção da extremidade N-terminal de um ou mais aminoácidos por peptidases, resultando em nova proteína com função alterada. (c) Remoção de um ou mais aminoácidos da extremidade C-terminal, resultando em proteínas com funções distintas. (d) Divisão de proteínas. A atividade proteolítica resulta em duas espécies estáveis, ambas capazes de exercer atividade potencialmente diferente.

Uma vez que eventos de sinalização celular que envolvem a atividade de proteases são essencialmente irreversíveis (a clivagem das proteínas-alvo resulta na geração de novos N-terminais), é possível derivar a sequência peptídica que antecede o sítio de clivagem por análise bioinformática dos peptídeos identificados, utilizando banco de dados (este racional metodológico é a base do algoritmo desenvolvido por Schilling *et al.* (94). Além disso, os novos N-terminais gerados por proteólise constituem “assinaturas” proteolíticas que podem ser utilizadas para correlação com a(s) protease(s) que os geraram. Embora esta correlação não possa ser considerada inequívoca, as assinaturas proteolíticas são importantes indícios de atividade proteolítica para enzimas cuja especificidade primária está bem estabelecida, como é o caso das catepsinas, caspases e algumas metaloproteases de matriz (94). O desenvolvimento de técnicas de enriquecimento N-terminal tem sido contínuo, sendo comumente categorizadas em seleção positiva ou negativa de peptídeos N-terminais. Estas abordagens consistem em métodos de marcação química de N-terminais antes da digestão enzimática e subsequente captura direta de peptídeos N-terminais (seleção positiva) ou remoção de peptídeos internos para posterior análise dos peptídeos N-terminais (seleção negativa) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Técnicas de enriquecimento de N-terminal proteico por seleção positiva e negativa

<b>Seleção positiva</b>	<b>Seleção Negativa</b>
Biotinilação do N-terminal (Capturada por Avidina)	COFRADIC <sup>2</sup>
N-CLAP <sup>1</sup>	DICAS <sup>3</sup>
Guanidação da cadeia lateral de lisina	TAILS <sup>4</sup>
-	Phospo-tagging
-	Reagente reativo a amina imobilizada
-	Clivagem do Brometo de Cianogênio

<sup>1</sup>N-CLAP – Chemical labeling of the Alpha Amine of Proteins

<sup>2</sup>COFRADIC – Combined Fractional Diagonal Chromatography

<sup>3</sup>DICAS – Dimethyl Isotope-Coded Affinity Selection

<sup>4</sup>TAILS – Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates

Fonte: Adaptado de (82)

Uma das principais características da seleção positiva é a capacidade de enriquecimento de peptídeos com aminas primárias livres, não sendo adequada para o estudo de N-terminais com modificações químicas naturais, como a acetilação ou formação de piroglutamato, enquanto que a seleção negativa permite o

enriquecimento tanto de N-terminais livres quanto de peptídeos modificados naturalmente (95). Como método de seleção positiva, Mahrus *et al.* (96) sugeriu a biotinilação de aminas primárias livres, por meio da ligação de biotina ao  $\alpha$ -amino grupo, digestão tripsínica das proteínas e subsequente captação dos N-terminais modificados, por avidina imobilizada. A limitação dessa técnica inclui a eficiência da ligação (96). Em contrapartida, a técnica de seleção negativa TAILS (*Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*), permite o enriquecimento N-terminal em distintas aplicações, como cultivo celular e análises bioquímicas (44). As aminas primárias livres dos N-terminais e da cadeia lateral de resíduos de lisina, são bloqueados isotopicamente por metilação redutiva. Após a tripsinização, os peptídeos bloqueados, modificados quimicamente, são separados dos peptídeos internos (NH<sub>2</sub> livre) por meio do polímero (dendrômero de aldeídos e poliglicerol) que se liga aos peptídeos internos, com aminas primárias livres. Os peptídeos modificados naturalmente, apresentando modificações como acetilação, metilação, ciclização, são enriquecidos juntamente com os peptídeos bloqueados isotopicamente (44).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste projeto é identificar, de forma sistêmica, possíveis marcadores moleculares associados a processos proteolíticos em melanoma.

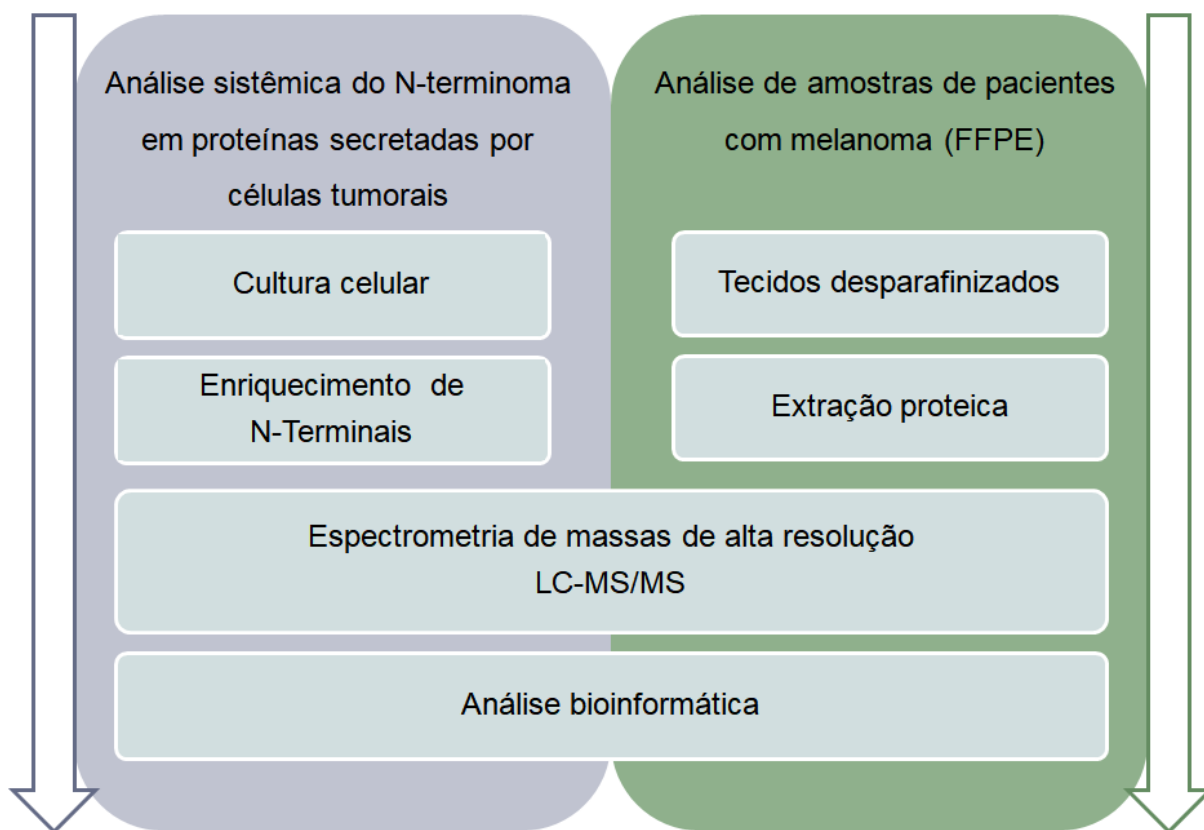
### **2.2 Objetivos específicos**

- (1) Analisar qualitativamente e quantitativamente o secretoma de células normais e tumorais de melanoma utilizando abordagens proteômicas associadas à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS);
- (2) Identificar as principais modificações pós-traducionais presentes no N-terminal das proteínas secretadas, utilizando técnicas de enriquecimento de N-terminal das proteínas secretadas no meio de cultura celular, seguido de análise por LC-MS/MS destas amostras;
- (3) Correlacionar os resultados obtidos com possíveis efeitos oriundos de eventos de processamento (proteolítico ou não) do N-terminal das proteínas secretadas, utilizando análise bioinformática;
- (4) Analisar qualitativamente e quantitativamente amostras de pacientes com melanoma e correlacionar com os resultados obtidos da análise dos secretomas;
- (5) Realizar a anotação funcional do N-terminoma identificado e integrar os resultados obtidos com vias biológicas possivelmente envolvidas no processo tumorigênico.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 5 apresenta de forma resumida as etapas conduzidas nesse trabalho.



**Figura 5** - Estratégia experimental desenvolvida neste trabalho.

#### 3.1 Linhagens celulares

As linhagens em estudo foram selecionadas com o objetivo de investigar, diferentes tipos celulares relacionados ao melanoma. Com este objetivo, 6 linhagens distintas foram investigadas, são elas:

- Um conjunto de linhagens pareadas: fibroblastos associados ao melanoma humano (isolados a partir de um sítio de metástase pulmonar,) linhagem Hs. 895 T e uma linhagem de fibroblastos de pele (derivada do mesmo paciente) Hs. 895 Sk;

- Um conjunto de linhagens pareadas de melanócitos murinos (normal e transformado), linhagens Melan-a e Tm1, respectivamente;
- Uma linhagem, isolada de fonte primária de melanoma humano maligno (linhagem A375);
- Uma linhagem celular derivada da efusão pleural de um paciente com melanoma metastático (linhagem SH-4).

As linhagens Hs 895 Sk, Hs 895 T, e SH4 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Estados Unidos). A linhagem A375 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e as demais linhagens (murinas; Melan A e TM1) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Roger Chamas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Octávio Frias de Oliveira (ICESP).

A seguir, na Tabela 4, segue uma classificação geral das linhagens celulares de acordo com o organismo, tecido, tipo celular, patologia e fonte de obtenção.

**Tabela 4** - Características das linhagens celulares utilizadas neste estudo

<b>Linhagem celular</b>	<b>Organismo</b>	<b>Tecido</b>	<b>Tipo Celular</b>	<b>Patologia</b>	<b>Fonte de Obtenção</b>
Hs. 895 Sk (ATCC® CRL-7636™)	<i>Homo sapiens</i>	Pele	Fibroblasto dermal	Normal	Isolado do mesmo paciente que a célula Hs. 895 T
Hs. 895 T (ATCC® CRL-7637™)	<i>Homo sapiens</i>	Pele	Fibroblasto	Tumoral	Fibroblastos associados ao melanoma (isolados de um nódulo metastático pulmonar)
A375 (ATCC® CRL-1619™)	<i>Homo sapiens</i>	Pele	Melanócito	Tumoral	Melanoma maligno
SH4 A375 (ATCC® CRL-7724™)	<i>Homo sapiens</i>	Efusão Pleural	Epitelial	Tumoral	Efusão pleural de paciente com Melanoma maligno
Melan A	<i>Mus musculus</i>	Pele	Melanócito	Normal	Melanoblastos epidermal de embriões de camundongos C57BL
TM1	<i>Mus musculus</i>	Pele	Melanócito	Tumora	Melanoblastos epidermal de embriões de camundongos C57BL

### **3.2 Amostras de pacientes**

Foram analisadas amostras de 12 pacientes com diferentes tipos de melanoma. Os cortes histológicos fixados em formalina e emblocados em parafina foram gentilmente cedidos pelo Dr. Frank Meiss, do Departamento de Dermatologia do Hospital Universitário de Freiburg – Alemanha (*Universitäts Klinikum Freiburg*). Na tabela 5, está apresentada a descrição detalhada destas amostras.

**Tabela 5** - Características dos tecidos de pacientes utilizados neste estudo

Amostra	Material	Data de Nascimento	Sexo <sup>1</sup>	Tipo de melanoma	Espessura do tumor <sup>2</sup>	Classificação de CLARK <sup>3</sup>	Status atual	Data de diagnóstico	Data do óbito	Sobrevida <sup>4</sup>	Morte causada por tumor
1	Tumor primário	26/10/1949	f	Melanoma de espalhamento superficial (MÊS)	0.85	3	Vivo	11/08/2005			
2	Tumor primário	22/07/1941	m	Melanoma de espalhamento superficial (MÊS)	1.45	3	Vivo	02/08/2006			
3	Tumor primário	09/10/1932	f	Melanoma maligno nodular (MN)	5.30	4	Óbito	19/10/2007	07/11/2015	2941	n
4	Tumor primário	26/04/1942	m	Melanoma maligno nodular (MN)	1.30	3	Vivo	27/06/2003			
5	Tumor primário	24/03/1954	m	Melanoma de espalhamento superficial (MÊS)	1.10	4	Vivo	12/08/2006			
6	Tumor primário	20/06/1919	m	Melanoma maligno nodular (MN)	1.20		Vivo	09/05/2003			
7	Tumor primário	13/07/1955	m	Melanoma maligno nodular (MN)	8.01	4	Óbito	13/06/2007	21/02/2013	2080	s
8	Tumor primário	04/08/1943	m	Melanoma lentigo maligno (MLM)	6.00	5	Óbito	30/05/2011	24/11/2013	909	s
9	Tumor primário	23/03/1938	m	Melanoma de espalhamento superficial (MÊS)	8.10	4	Óbito	09/05/2011	17/06/2012	405	s

(Continuação)

10	Tumor primário	12/05/1952	m	Melanoma de espalhamento superficial (MÊS)	1.70	4	Óbito	02/02/2010	02/10/2013	1338	s
11	Tumor primário	30/11/1953	m	Melanoma maligno nodular (MN)	1.00	4	Vivo	17/10/2006			
12	Tumor primário	23/01/1916	m	Melanoma maligno nodular (MN)	6.01	5	Óbito	02/09/2009	21/04/2010	231	s

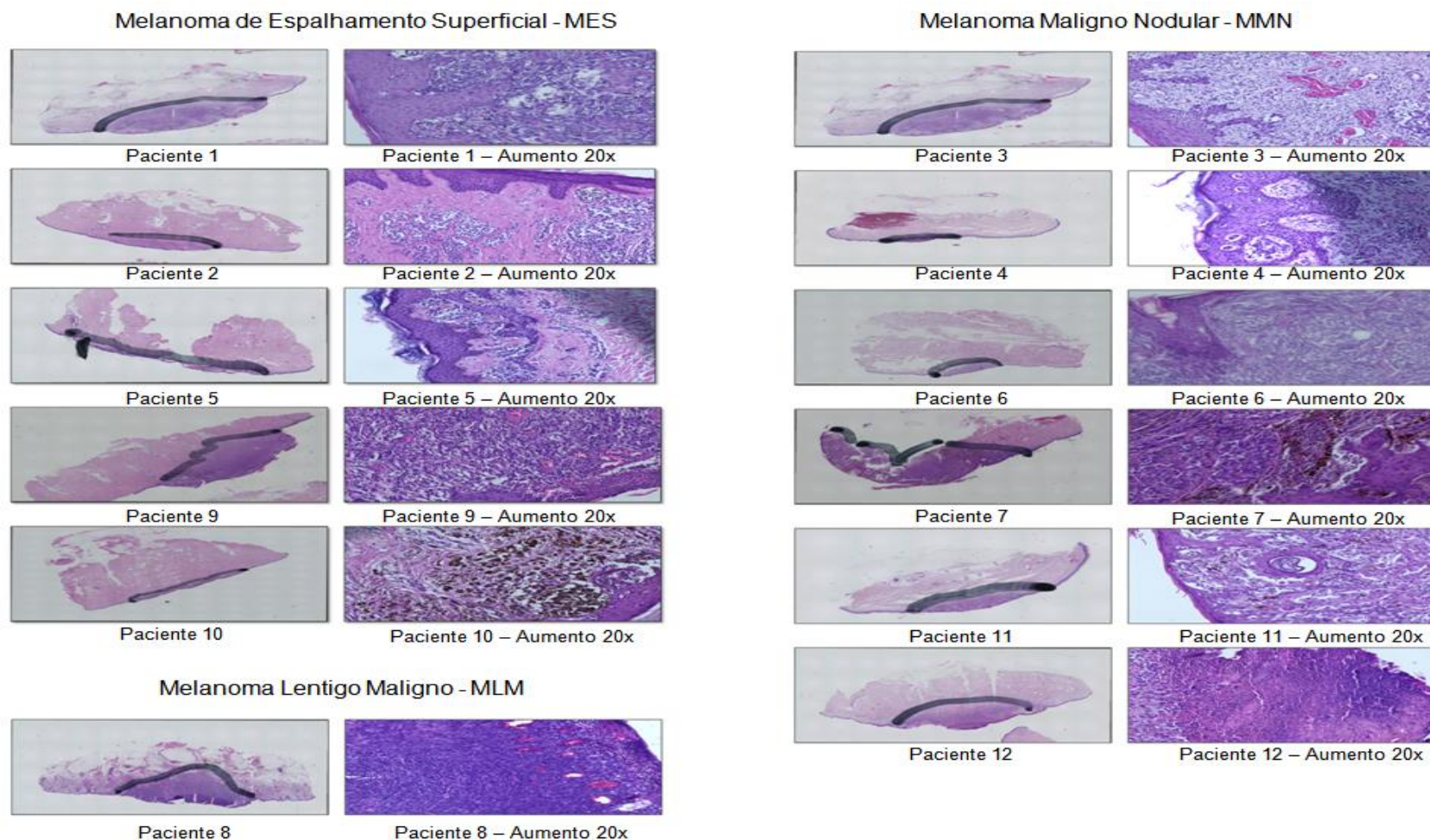
<sup>1</sup>Sexo – (m) masculino (f) feminino

<sup>2</sup>Espessura do tumor – Classificação de Breslow

<sup>3</sup>Classificação de CLARK – 5 níveis distintos referentes ao nível anatômico (97).

<sup>4</sup>Sobrevida – Dias de vida entre a data do diagnóstico e a data de óbito

A Figura 6 apresenta os cortes histológicos dos pacientes em estudo, observadas em microscópio invertido



**Figura 6** – Cortes histológicos de 12 pacientes organizados por tipo de Melanoma (Melanoma Expansivo Superficial; Melanoma Maligno Nodular; Melanoma Lentigo Maligno). A região destacada em preto corresponde às áreas tumorais selecionadas para microdissecação. Imagens obtidas em microscópio invertido Keyence BZ-9000.

### 3.3 Cultivo celular

As linhagens humanas foram mantidas sob cultura em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com L-glutamina 4 mM, 1.5g/L de piruvato de sódio, 4.5 g/L de glicose, 0,1 g/L de sulfato de estreptomicina e 0,025 g/L ampicilina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera controlada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias e as células subcultivadas regularmente. As subculturas foram obtidas por descolamento com solução estéril de tripsina 0,25% - EDTA 1mM. Estoques de células foram congelados na presença de crioprotetor (Dimetilsulfóxido - DMSO a 10 %), acondicionados em ampolas e mantidos em nitrogênio líquido. As linhagens murinas TM1 e Melan-a foram mantidas sob cultura em meio “*Roswell Park Memorial Institute*” – RPMI (pH 6.9; Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetato – TPA 200 nM, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 0,1 g/L de sulfato de estreptomicina e 0,025 g/L de ampicilina.

### 3.4 Caracterização das linhagens Celulares

#### 3.4.1 Curva de Crescimento

Um volume correspondente a  $5,4 \times 10^4$  células foi plaqueado em placas multiwell de 6 poços - (P6; 9,6 cm<sup>2</sup>) e foram realizadas contagens do número de células a cada 24 horas, por 9 dias no total. A troca do meio condicionado foi realizada a cada dois dias.

A partir do estabelecimento da curva de crescimento, realizamos derivações específicas, inerentes ao tipo celular e às condições de cultivo, como o tempo de adaptação (fase *lag*), a fase exponencial de crescimento (fase *log*) e a densidade de saturação (platô). Para o cálculo do tempo de dobramento bem como o número de dobramentos da população celular, utilizamos as fórmulas disponíveis em Freshney

(98), apresentadas em Anexo 1. A densidade de saturação foi obtida pelo cálculo da média entre os três valores pertencentes ao platô. Nesse momento as culturas celulares estavam confluentes em sua totalidade.

Os parâmetros mensurados a seguir foram necessários para a avaliação do efeito do carenciamento, que consiste na incubação das células em meio de cultura, na ausência de soro fetal bovino – SFB, que contém fatores de adesão e fatores de crescimento essenciais para a manutenção das células em cultura. Avaliamos o efeito do carenciamento na proliferação celular, a viabilidade das células, bem como o tempo de adesão das células em garrafas de cultivo.

### **3.4.2 Efeito do carenciamento na proliferação celular**

Uma vez que a abordagem proposta para este projeto visa o estudo de proteínas secretadas, o carenciamento foi necessário na tentativa de evitar a contaminação das proteínas secretadas pelas linhagens em cultura com proteínas oriundas do SFB às. Para avaliarmos o efeito do carenciamento na proliferação celular, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $5,0 \times 10^3$  células/ poço, em placas de 96 poços. Após 24 horas, o SFB foi removido e as culturas incubadas por mais 24 horas. Findo este período, a proliferação celular foi avaliada utilizando o kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), conforme instruções fornecidas pelo fabricante.

### **3.4.3 Tempo de aderência em cultura**

Estimamos o tempo em que as células permanecem aderidas na garrafa de cultura (T175) na ausência de SFB, por visualização em microscópio invertido. Para tal observação, realizamos o carenciamento conforme o protocolo de coleta de secretoma. As culturas carenciadas foram monitoradas por um período de 48 horas.



#### 3.4.4 Viabilidade (exclusão do corante azul de tripan)

A viabilidade das células, após 48 horas de carenciamento, foi avaliada pela adição do corante azul de tripan, baseado no princípio de que células vivas com membrana celular intacta, não são permeáveis ao corante (99). A contagem das células foi realizada por meio de hemocítômetro (câmara de Neubauer) e os resultados foram expressos na forma de porcentagem de células viáveis entre o total de células contadas, seguindo o cálculo abaixo:

$$\text{Número de células azuis (mortas)} / (\text{total de células contadas}) \times 100$$

### 3.5 Coleta do secretoma

Para a coleta do secretoma, foi utilizado o protocolo descrito por Kleifeld *et al.* (44), com algumas modificações. Após as culturas atingirem aproximadamente 80% de confluência, em garrafas de cultivo T175, as células foram careciadas, ou seja, mantidas em meio apropriado, na ausência de soro fetal bovino – SFB e vermelho de fenol. Para tal, as culturas foram lavadas três vezes com solução- fosfato-salina tamponada – PBSA (sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), para a remoção de quaisquer proteínas oriundas do SFB. Após o carenciamento, as culturas foram mantidas por 24 horas para a coleta do meio condicionado (secretoma). No momento da coleta do secretoma adicionamos inibidores de proteases (EDTA 10 mM, concentração final) e um coquetel de inibidores (Protease inhibitor cocktail™ Sigma) contendo Hemissulfato de leupeptina, EDTA, E-64, Hidrocloreto de Bestatina, Aprotinina, AEBSF, a fim de minimizar a hidrólise adicional por proteases ativas presentes nos secretomas.

Após a adição dos inibidores de proteases, o meio condicionado foi centrifugado (2200 x g, 4°C, 10 min) e filtrado, por meio de filtros Millipore Steriflip (0.22 µm) para remoção de quaisquer células em suspensão. Os secretomas foram obtidos após a concentração proteica (Vivaspin 20, 3 kDa *cutoff*, GE Healthcare, USA). Após a concentração de aproximadamente 150x dos secretomas, efetuamos

a troca de tampão da solução, adicionando ao volume proteico concentrado (1 mL), 9 mL de HEPES 100 mM pH 7.0 e submetendo esta mistura novamente a concentração para o volume final de 1 mL, conforme descrito anteriormente.

### **3.6 Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas presentes nos secretomas foi realizada, em triplicata, utilizando o reagente de Bradford (100). Para estimar o teor proteico das amostras foi utilizado uma curva padrão, construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (Sigma) preparada em água MilliQ®. Alternativamente, a quantificação de proteínas foi realizada, em triplicata, utilizando o ácido bicinonínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

### **3.7 Eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida**

As análises foram realizadas como descrito por Laemmli (101). Foram utilizados géis de 10 x 8 cm x 1.5 mm e um sistema de eletroforese Hoefer (GE Healthcare). As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 min, aplicadas em gel de empilhamento (4% de poliacrilamida) e as proteínas separadas em gel de separação (12% de poliacrilamida) sob condições redutoras. As corridas foram realizadas em temperatura ambiente. Para a coloração do gel foi utilizado Nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Mortz *et al.* (102).

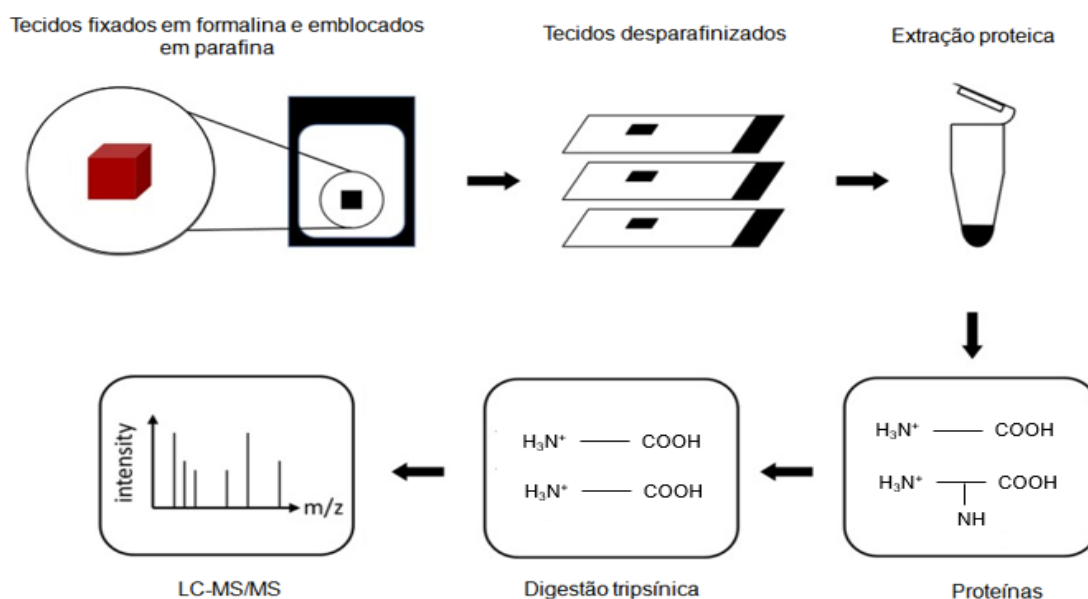
### **3.8 Zimografia**

A zimografia foi realizada para se evidenciar a presença de proteinases com atividade sobre gelatina (um substrato incorporado ao gel de SDS-poliacrilamida). Foi utilizado o método descrito por Heussen *et al.* (103) com algumas modificações. Para este ensaio, foram utilizados géis (10 x 8 cm x 1,00 mm) na concentração de 12% de poliacrilamida, contendo gelatina (na concentração final de 1mg/ml). A eletroforese ocorreu em temperatura ambiente, voltagem de 150 V, corrente de 40 mA por gel e

sob condições não redutoras. Após a corrida os géis foram lavados por 30 minutos em solução tampão Tris-HCL 50 mM pH 8,0, contendo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida foram lavados por 10 minutos com água destilada e imersos na solução de incubação (Tris-HCL 50mM pH 8,0 com 10 mM de CaCl<sub>2</sub> , 200mM de NaCl e 0,02% Igepal) por 18 horas a 37°C. O gel foi submetido ao processo de revelação de bandas proteicas utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). A avaliação da atividade proteolítica deu-se com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

### 3.9 Preparo das amostras de pacientes com melanoma

As amostras de pacientes foram preparadas conforme o esquema resumido na Figura 7.



Fonte: Adaptado de (41).

**Figura 7** - Procedimento de desparafinização e análise proteômica das amostras de tecidos de pacientes fixadas em parafina.

### **3.9.1 Desparafinização dos tecidos tumorais**

Os blocos de tecidos parafinizados passaram por um processo de desparafinização com diferentes solventes orgânicos, xilol, etanol e água destilada, respectivamente. Inicialmente as lâminas permaneceram 5 minutos em xilol concentrado, por 4 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, por meio de banho em etanol 99% por 5 minutos (2 vezes), etanol 96%, etanol 70% e etanol 50% (por apenas alguns segundos). Para finalizar esse processo, as lâminas permaneceram imersas em água destilada até o procedimento seguinte, de microdissecação.

### **3.9.2 Microdissecação**

Com o objetivo de reduzir as variações celulares adjacentes ao tumor (remoção das células circunvizinhas ao tecido tumoral), realizamos a microdissecação manual dos blocos de tecidos desparafinizados, orientados pelas lâminas coradas apresentadas na Figura 6.

## **3.10 Análise proteômica**

### **3.10.1 Extração de proteínas das amostras de pacientes com melanoma e análise proteômica (*shotgun*)**

Os tecidos tumorais foram transferidos para microtubos individuais, e foi adicionado tampão de lise, composto por HEPES 90 mM em pH 8.0, DTT 0.2 mM, e 1% da solução Rapigest® (Waters, USA). As amostras foram aquecidas em bloco de aquecimento a 95°C, por 4 horas, sob agitação. Após resfriamento, foram submetidas à banho ultrassônico (*Bioruptor® plus*; Diagenode), por 10 minutos. Foram adicionados 5 µg de tripsina e incubadas por 18h a 37°C, em seguida, centrifugadas a 14.000 x g

por 15 minutos. As amostras foram então reduzidas e alquiladas com a adição de TCEP 10 mM, IAA 30 mM e DTT, por 15 minutos a 37°C, respectivamente. Foi adicionado Hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 3M e o pH foi ajustado para pH 3.0, com ácido clorídrico. Em seguida, incubadas por mais 30 minutos a 37°C e posteriormente centrifugadas a 14.000 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos novos e dessalinizados, utilizando o protocolo de microextração em fase sólida, conforme descrito por Rappsilber *et al.* (104) em resina C-18, eluindo-se os peptídeos em 80% de acetonitrila. As amostras foram secas em sistema de concentração à vácuo (SpeedVac) e submetemos 3 µg a análise LC-MS/MS, quantificados por BCA.

### **3.10.2 Análise proteômica (*shotgun*) dos secretomas celulares**

Foram precipitados 100 µg de proteínas dos secretomas das linhagens celulares humanas (A375, SH4, Hs. 895 Sk e Hs. 895 T), com acetona (4 volumes) e metanol (1 volume), por 18 horas a -80°C. Os precipitados proteicos foram dissolvidos em 50 µL de GuHCl 6M, com seguida adição do mesmo volume de HEPES 100 mM, pH 7.5. Foi adicionado DTT (concentração final de 5 mM) para a redução das pontes dissulfeto e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após redução, foi adicionado Iodoacetamida – IAA (concentração final de 15 mM) para alquilação dos grupos tióis livres dos resíduos de cisteínas, incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. O excesso de IAA foi consumido pela adição de DTT, na concentração final de 15 mM, seguida de 20 minutos de incubação em temperatura ambiente. As amostras foram dessalinizadas (*Clean Up*) por meio da precipitação com acetona (8 volumes) e metanol (1 volume), incubadas a -80°C por 2 horas. Em seguida, foram centrifugadas (14.000 x *g*, 4°C, 10 minutos), e o sobrenadante foi removido. Repetidas centrifugações (3x) com metanol (1 volume) foram realizadas e os pellets proteicos foram ressuspensos para a concentração de 1 µg/µL, com NaOH (Concentração final de 10 mM), HEPES (concentração final de 50 mM) e água MilliQ. Posteriormente, submetidos a digestão tripsínica em solução (1:100 massa/massa, enzima:proteínas) de acordo com Kleifeld *et al.* (44). Os peptídeos resultantes foram então marcados via dimetilação isotópica redutiva, com soluções

de formaldeído e cianoborohidreto (leve e pesado), na concentração final de 40 mM e 20 mM, respectivamente, de acordo com Boersema *et al.* (105). Em seguida foram incubadas por 18 horas a 37°C e a marcação foi reforçada, com as mesmas soluções (concentrações finais de 20 mM e 10 mM, respectivamente) e incubadas por mais 2 horas a 37°C. Tris 100 mM (concentração final), pH 6.8, foi adicionado para o consumo do excesso de formaldeído, incubado por 1 hora a 37°C. As amostras foram então combinadas na razão 1:1, em dois *Pools*, conforme a Tabela 6.

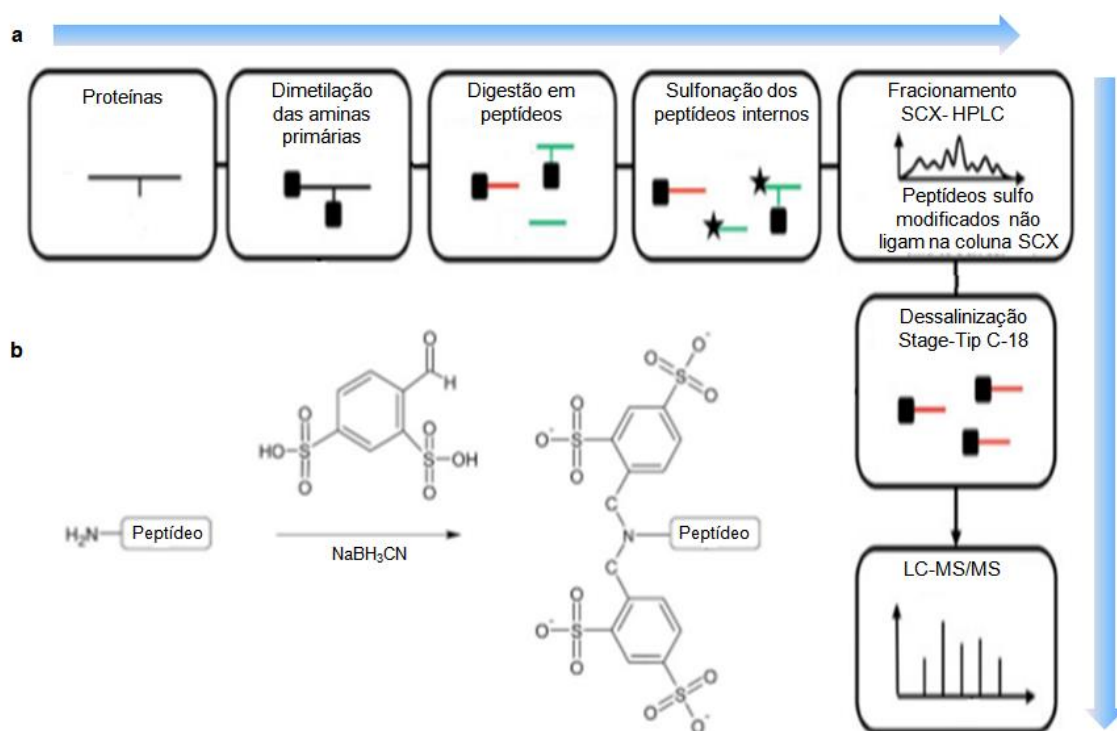
**Tabela 6** - Marcação isotópica dos peptídeos e combinação comparativa

<b><i>Pool de peptídeos</i></b>	<b>Dimetilação isotópica redutiva</b>			<b>Incremento de massa (Da)</b>
A375 + SH4	A375	Formaldeído leve ( $^{12}\text{COH}_2$ )	Cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) leve	28.03
	SH4	Formaldeído pesado ( $^{13}\text{CD}_2\text{O}$ )	Cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBD}_3\text{CN}$ ) pesado	36.07
Hs. 895 Sk + Hs. 895 T	Hs. 895 Sk	Formaldeído leve ( $^{12}\text{COH}_2$ )	Cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) leve	28.03
	Hs. 895 T	Formaldeído pesado ( $^{13}\text{CD}_2\text{O}$ )	Cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBD}_3\text{CN}$ ) pesado	36.07

A dessalinização das amostras foi realizada por meio de colunas C18 (Cartridges, 3M Empore SPE Extraction disks, USA), eluindo-se os peptídeos em acetonitrila 80% em ácido fórmico 0,1%. Em seguida as amostras foram concentradas em sistema à vácuo (SpeedVac), ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 0,1% e 15  $\mu\text{L}$  foram submetidos à análise por LC-MS/MS.

### 3.10.3 Seleção negativa e enriquecimento de N-terminais proteicos por sulfonação dos peptídeos internos

A seleção negativa de N-terminais tem o foco na remoção de peptídeos internos, enriquecendo as amostras tanto com N-terminais livres, quanto aqueles modificados naturalmente (92). A figura 8, ilustra a estratégia proposta por Lai *et al.* (82), baseada na remoção dos peptídeos internos, por reversão da carga dos peptídeos internos, seguida do fracionamento por cromatografia de troca catiônica.



**Figura 8** - (a) Enriquecimento de N-Terminais por Reversão de Carga. As aminas primárias dos N-Terminais proteicos e da cadeia lateral da Lisina são protegidas por dimetilação. As proteínas dimetiladas são digeridas por tripsina, e os peptídeos internos com N-Terminal livre são modificados por Ácido 4-formilbenzeno 1,3-disulfônico. Os peptídeos dimetilados são enriquecidos por cromatografia de troca catiônica seguida por análises de massas. (b) Reação de sulfonação por ácido 4-formilbenzeno 1,3-dissulfônico e  $NaBH_3CN$ . Fonte: Adaptado de (82).

Os secretomas das linhagens murinas Melan-A e TM1 foram submetidos ao enriquecimento dos N-terminais pelo método da reversão de carga N-terminal dos peptídeos internos, conforme descrito na Figura 9. Inicialmente, 500  $\mu g$  de proteínas foram precipitadas, desnaturadas, reduzidas e alquiladas, conforme já descrito anteriormente. As proteínas foram então marcadas via dimetilação isotópica

redutiva, com formaldeído/cianoborohidreto (leve e pesado), na concentração de 40 mM e 20 mM, respectivamente, conforme descrito por Borsema *et al.* (105). As soluções foram incubadas por 18 horas a 37°C e em seguida, foram adicionados formaldeído 20mM (concentração final) e cianoborohidreto 10 mM (concentração final), incubadas por 2 horas a 37°C, para o reforço da marcação leve e pesada. O excesso de formaldeído foi consumido pela adição de Tris 100 mM (concentração final), incubados por 1 hora a 37°C, e as amostras foram então combinadas na razão 1:1, em um *Pool*, conforme a Tabela 7.

**Tabela 7** - Marcação isotópica dos peptídeos e combinação comparativa.

<b><i>Pool de proteínas</i></b>	<b>Dimetilação isotópica redutiva</b>			<b>Incremento de massa (Da)</b>
Melan A + TM1	Melan-A	Formaldéido leve ( <sup>12</sup> COH <sub>2</sub> )	Cianoborohidreto de sódio (NaBH <sub>3</sub> CN) leve	28.03
	TM1	Formaldeído pesado ( <sup>13</sup> CD <sub>2</sub> O)	Cianoborohidreto de sódio (NaBD <sub>3</sub> CN) pesado	36.07

A dessalinização (*Clean Up*) foi realizada por precipitação com acetona (4 volumes) e metanol (1 volume), incubadas a -80°C por 2 horas. Em seguida, centrifugadas (14.000 x g, 4°C, 15 minutos), e o sobrenadante foi descartado. As centrifugações foram repetidas (3x) com metanol (1 volume), para a completa dessalinização. As amostras foram ressuspensas para a concentração de 1 µg/µL, com NaOH (concentração final de 10 mM), HEPES (concentração final de 50 mM) e água MilliQ. A digestão tripsínica em solução (1:100 massa/massa) foi realizada de acordo com Kleifeld *et al.* (44). Após a digestão tripsínica, os peptídeos foram dessalinizados (*Clean Up*) em Stage Tip C-18, conforme descrito por Rappsilber *et al.* (104). Os peptídeos internos foram submetidos a reversão de carga dos N-terminais pela adição de Ácido 4-formilbenzeno 1,3-disulfônico (A4FD), concentração final de 20 mM e cianoborohidreto de sódio, na mesma concentração,

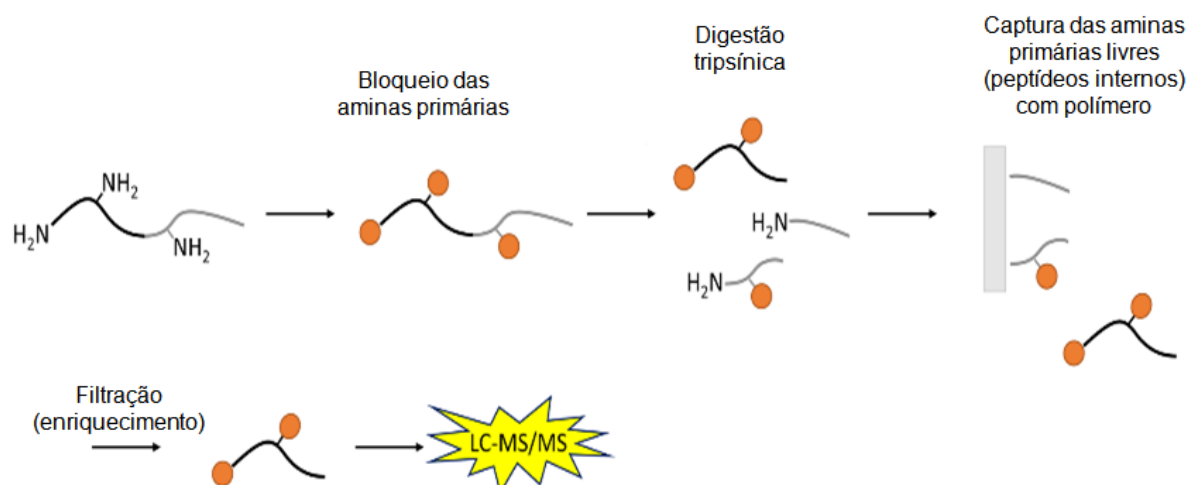


incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. A reversão de carga foi reforçada pela adição de A4FD e cianoborohidreto de sódio em duas etapas: (i) A primeira etapa na concentração de 40 mM (concentração final), incubadas por 1 hora; (ii) A segunda, na concentração de 60 mM, por 18 horas, a temperatura ambiente. O excesso de A4FD foi consumido pela adição de Tris (pH 6.8), na concentração final de 100 mM, por 1 hora, a temperatura ambiente. As amostras foram dessalinizadas em Stage Tip C-19 (104), e concentradas em sistema à vácuo (SpeedVac). Para o fracionamento e enriquecimento dos N-terminais, os peptídeos foram ressuspensos em solução de acetonitrila 15% e ácido acético 1%, e submetidas a cromatografia por troca catiônica em micro escala (StageTip SCX). Os peptídeos foram eluídos em soluções salina (NaCl), em diferentes concentrações, 150 mM e 500 mM, respectivamente. As amostras foram novamente dessalinizadas em StageTip C-18, concentradas em SpeedVac, ressuspensas em 50 µL de ácido fórmico 0,1% e 10 µL submetidos à análise por LC-MS/MS.

#### **3.10.4 TAILS - Seleção negativa e enriquecimento de N-terminais proteicos utilizando dendrímero de aldeídos**

As etapas descritas a seguir, correspondem a atividades desenvolvidas no laboratório do prof Dr. Oliver Schilling, do departamento de Medicina e Biologia Molecular da Universidade de Freiburg, Alemanha, durante um estágio de doutorado sanduíche (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) compreendido entre os meses de Abril e Outubro de 2017.

Os secretomas das linhagens humanas A375, SH4, Hs. 895 Sk e Hs. 895 T, foram submetidos ao enriquecimento dos N-terminais por meio de polímero (aldeído poliglicerol dendrítico), que se liga as aminas primárias livres dos peptídeos tripsínicos internos, conforme descrito na Figura 9.



Fonte: Adaptado de (49).

**Figura 9** - Representação esquemática para o enriquecimento de N-Terminais por meio de polímero.

Foram utilizados 1 mg de proteínas para cada replicata biológica dos secretomas das diferentes linhagens. A replicata 1 da A375 foi marcada com formaldeído pesado e cianoborohidreto leve (+34,06), sendo denominada como marcação *média*. A replicata 2 da A375 foi marcada com formaldeído pesado e cianoborohidreto pesado (+36.07 Da), sendo denominada como *pesada*. O mesmo raciocínio foi estabelecido para as linhagens SH4 e Hs. 895 Sk. A replicata da linhagem tumoral, e Hs. 895 T foi marcada com formaldeído pesado e cianoborohidreto pesado (+36.07 Da). Em seguida, Tris (pH 6.8), na concentração final de 50 mM, foi adicionado para o consumo do excesso de formaldeído e os *Pools* foram combinadas na razão 1:1, determinados por BCA. A dessalinização (*Clean Up*) foi realizada por precipitação com acetona (9 volumes) e metanol (1 volume), incubadas a -80°C por 2 horas. Os *pellets* proteicos foram ressuspensos em 1 mL de NaOH 1M e HEPES 200 mM (concentração final) e submetidos a digestão tripsínica em solução (1:100 massa/massa enzimas:proteínas) de acordo com Kleifeld *et al.* (44). Cianoborohidreto de sódio, na concentração final de 50 mM e um volume específico, correspondente a 10 mg de polímero, foram adicionados. Após 30 minutos de incubação a 37°C, foi adicionado 50 mM de cianoborohidreto de sódio (concentração final) e incubadas por 18 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado glicina 100 mM (concentração final), incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas em filtros Vivaspin 500 (10 KDa *CutOff*) e centrifugadas

(14.000 x *g* por uma hora e meia). Os N-terminais dimetilados ou modificados naturalmente, foram coletados no filtrado, enquanto os peptídeos internos permaneceram ligados ao polímero. O polímero foi ainda lavado com adição de bicarbonato de amônio (100 mM; concentração final) e hidrocloreto de guanidina (2M, concentração final) e centrifugados (14.000 x *g*) até a passagem completa das soluções. Os filtrados foram então combinados e quantificados por BCA, em seguida concentrados em sistema à vacuo (SpeedVac). Para reduzir a complexidade das amostras, foi realizada cromatografia de fase reversa em coluna C18 (3.0 x 100 mm, Waters; Estados Unidos), utilizando um sistema de solventes de alto pH (Solvente A: Formiato de amônia, 10 mM, pH 10; Solvente B: Acetonitrila em Formiato de amônia, pH 10), com um gradiente de eluição de 3-60% B em 40 min. Após a coleta das frações (0,5 mL), determinamos a concentração das amostras pelo método do BCA, as amostras foram secas em SpeedVac e subtemos 3 µg de peptídeos (por amostra) à análise por LC-MS/MS.

### 3.10.5 Análise por espectrometria de massas

Uma alíquota de 15 µL das misturas peptídicas obtidas a partir dos experimentos descritos nos itens 3.9.2 e 3.9.3 foi injetada em uma coluna *trap* empacotada com C18 (100 µm diâmetro interno x 2 cm) e submetidas a dessalinização adicional com 100% do solvente A (ácido fórmico 0,1%). Peptídeos foram então eluídos em uma coluna analítica (75 µm diâmetro interno x 100 mm) empacotadas *in house* com *beads* acuc C-18 (tamanho de partícula de 5 µm) (Phenomenex, EUA). A cromatografia de fluxo nanométrico foi realizada em um sistema Easy nanoLC (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os peptídeos foram carregados para a coluna em solvente A (ácido fórmico 0,1%) e eluídos em um gradiente linear de 3 a 30 % de solvente B (acetonitrila em ácido fórmico 0,1%) por 120 min, em um fluxo de 200 nL/min. A voltagem do spray foi ajustada para 2.1 kV a 200 °C e o espectrometro de massas foi operado em modo dependente de dados (*Data Dependent Acquisition - DDA*), no qual uma varredura de massas na região de *m/z* de 300 a 1650 é realizada, seguida por dissociação induzida por colisão (CID)

dos 15 íons de maior intensidade (top 15). Os espectros MS (*full scan*) foram adquiridos no analisador Orbitrap, com resolução 60,000 (em 400 m/z). A exclusão dinâmica foi definida por uma lista de 500 m/z, com duração de 60 s. Utilizamos um *target value* de AGC de  $10^6$  para os eventos de MS1 e de  $10^4$  íons para os eventos de MS/MS. O limite inferior para varredura de íons precursores foi definido como 3000 contagens. Todas as amostras foram avaliadas na forma de três replicatas biológicas.

Alternativamente, as amostras analisadas no laboratório do professor Dr. Oliver Schilling (seções 3.9.1 e 3.9.4), foram analisados em espectrometro de massas QExactive plus acoplado a um sistema Easy nano LC 1000 (Thermo Scientific) em modo positivo. O quantitativo de 3 µg das misturas peptídicas foi ressuspendido em 40 µL de ácido fórmico 0,1% e uma alíquota de 5 µL foi injetada em uma coluna *trap* empacotada com C18 (100 µm diâmetro interno x 2 cm) e submetidas a dessalinização adicional com 100% do solvente A (ácido fórmico 0,1%). Os peptídeos foram carregados em uma coluna analítica Acclaim PepMap (Thermo Scientific, EUA), com 2 µm de tamanho de partícula, poro de 100 Å, comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 50 µm e eluídos em um gradiente linear de 5 a 40% de Solvente B (acetonitrila em ácido fórmico 0,1%) por 80 minutos, em um fluxo de 300 nL/min. A voltagem do spray foi ajustada para 1.9 KV a 250 °C e o espectrometro de massas foi operado em modo dependentes de dados (*Data Dependent Acquisition – DDA*), no qual a varredura de massas na região de *m/z* de 300 a 2.000 é realizada, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 10 íons de maior intensidade (top 10). Os espectros MS (*full scan*) foram adquiridos no analisador Orbitrap, com resolução 70.000. Utilizamos um *target value* de AGC de  $3^6$  para os eventos de MS1 e de  $1^5$  para os eventos de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para isótopos, com duração de 40 s.

### 3.11 Processamento dos dados

#### 3.11.1 Análise proteômica quantitativa

Os dados brutos dos espectrômetros de massas (arquivos do tipo RAW) provenientes da digestão tripsínica em solução (análise *shotgun*) das amostras de pacientes e dos secretomas das linhagens celulares (subitens 3.9.1 e 3.9.2) foram analisados utilizando o software MaxQuant (versão 1.5.3.17). Uma taxa de falso positivos (*False Discovery Rate* - FDR) de 1% foi permitida para as identificações de proteínas e peptídeos. Os dados obtidos foram interrogados contra um banco de dados utilizando a estratégia *target-decoy* (106). O banco de dados (*target database*) foi restrito à taxonomia *Homo-sapiens*, (SwissProt + TrEMBL *release 07\_2017*; contendo 159.552 entradas). A este banco de dados combinou-se sequências de 245 contaminantes comuns, juntamente com as sequências reversas de todas as entradas (*decoy database*). A especificidade enzimática foi ajustada para tripsina (e semi tripsina) para os dados provenientes de amostras de pacientes), com permissão de no mínimo duas clivagens perdidas. A carbamidometilação da cisteína foi selecionada como modificação fixa, enquanto a oxidação da metionina, deamidação da glutamina/asparagina, e a acetilação do N-terminal de proteínas foram selecionados como modificações variáveis. Para as análises quantitativas nas quais utilizamos a dimetilação isotópica redutiva, a multiplicidade foi ajustada para 2 levando-se em conta os dois estados de derivatização dos peptídeos (dimetilação leve e pesada para N-terminais dos peptídeos e cadeias laterais de lisina). Para as amostras de pacientes (em que não houve marcação dos peptídeos tripsínicos), a função *Label Free Quantitation* (LFQ) foi habilitada. A identificação de peptídeos foi baseada na busca com uma tolerância de massa de  $\pm 7$  ppm para os íons precursores e  $\pm 20$  ppm para os íons-fragmento. Para a quantificação das proteínas, considerou-se a contagem de pelo menos duas razões (leve/pesado) e a função de 'Re-quantify' foi habilitada entre as corridas. A presença de peptídeos homólogos (característica comum entre proteomas complexos, como de vertebrados) resulta na identificação de 'grupos de proteínas'. Desta forma, para cada grupo proteico no arquivo "proteinGroups.txt", a

primeira entrada foi selecionada como representativa do grupo e para as análises bioinformáticas subsequentes.

### 3.11.2 Análise N-terminômica e anotação funcional

#### 3.11.2.1 Identificação e quantificação

Os dados brutos dos espectrômetros de massas (arquivos do tipo RAW) provenientes do protocolo de enriquecimento N-terminal das amostras de melanócitos pareados (subitem 3.9.4) foram analisados utilizando-se a plataforma *open source Trans Proteomics Pipeline* v.4.8 (Build 201411201551-6764) (107). Após conversão dos arquivos brutos para o formato aberto, mzML, a busca foi realizada contra o banco de dados restrito à taxonomia “Rodentia” (UniProt/SwissProt release 07\_2017; 36.407 entradas). Foi utilizado o algoritmo de busca Comet (versão 2014.02, rev. 2) (108). A especificidade enzimática foi ajustada para semi-Arg-C, uma vez que a tripsina é incapaz de clivar ligações peptídicas adjacentes a resíduos de lisina dimetilados (condição experimental oriunda do protocolo TAILS). A tolerância de massa para os íons-precusores e íons-filho foi ajustada para 20 ppm e 0.8 Da, respectivamente. Foram realizadas duas buscas:

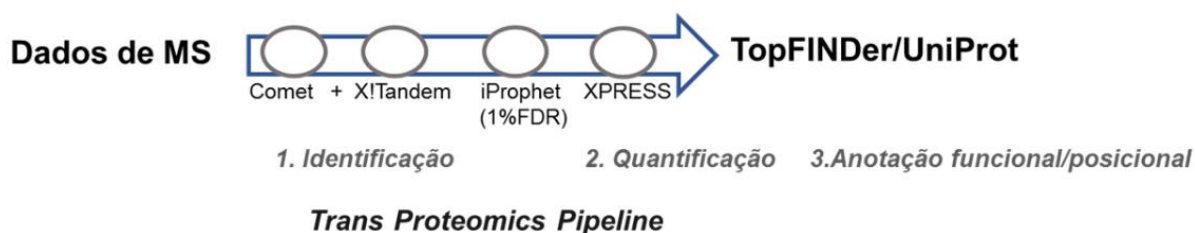
- (a) **N-terminal livre:** peptídeos que apresentam N-terminal livre e, portanto, foram dimetilados segundo o protocolo TAILS;
- (b) **N-terminal bloqueado:** peptídeos que apresentam modificações químicas, tais como acetilação ou ciclização do resíduo N-terminal em ácido piroglutâmico, por exemplo.

Para a busca representada pela situação em (a) foram selecionados como **modificações variáveis:** a oxidação da metionina (+15.99 Da) e deamidação de asparagina e glutamina (+0.98 Da). Como **modificações fixas**, foram selecionadas carbamidometilação de cisteína (+57.02) e dimetilação da cadeia lateral da lisina e do N-terminal peptídico, com a versão leve do formaldeído (+ 28.03 Da), para a linhagem Melan-a e a com a versão pesada do formaldeído (+36.07 Da) para a

linhagem Tm1. Para a situação apresentada em (b), foram selecionados como **modificações variáveis**: a acetilação no N-terminal de peptídeos (+ 42.01 Da), a ciclização de resíduos de glutamina e glutamato em ácido piroglutâmico (-17.02 e -18.01 Da, respectivamente) e a modificação de resíduos de cisteína N-terminais em ácido 3-carboxílico-5-oxotiomorpholino (-17.02 Da). As **modificações fixas** foram as mesmas descritas para a busca em (a).

### 3.11.2.2. Anotação funcional/posicional

Após obtenção da lista final de peptídeos (identificados, quantificados e submetidos à análise estatística para taxa final de falsos positivos  $\leq 1\%$ ) a anotação funcional dos dados de N-terminoma foi realizada utilizando a plataforma TopFINDER (109).



**Figura 10** - Fluxo de trabalho esquemático da análise dos espectros de MS/MS e anotação funcional/posicional dos dados de N-terminômica obtidos neste projeto.

### 3.11.2.3 Análise TAILS (A375/SH4/Hs. 895 Sk/ Hs. 895 T)

Os dados brutos dos espectrômetros de massas (arquivos do tipo RAW) provenientes do protocolo de enriquecimento N-terminal das linhagens celulares (A375, SH4, Hs. 895 Sk e Hs. 895 T) (subitem 3.9.4) foram analisados utilizando-se a plataforma *OpenMS* v2.2 (110). Após conversão dos arquivos brutos para o formato aberto, mzML, a busca foi realizada contra o banco de dados restrito à taxonomia "*Homo sapiens*" (UniProt/SwissProt release 06\_2017; 20.188 entradas, sem isoformas). Um número igual de sequências randomizadas foi adicionado,

derivados do banco de dados original. A completa análise de dados foi realizada com um fluxo totalmente automatizado dentro do *framework* do Open MS (110). As sequências peptídicas foram identificadas por MS-GF+ (111). A especificidade enzimática foi configurada para Semi Arg-C com massa de tolerância de 10 ppm para íons precursores e 20 ppm para os íons fragmentados e 3 clivagens perdidas foram permitidas. As modificações fixas aplicadas incluem carbamidometilação das cisteínas (+57,02 Da), dimetilação dos N-terminais e da cadeia lateral das lisinas (formaldeído leve 12COH2 (+28,03 Da); formaldeído pesado + cianoborohidreto leve 13COD2 (+34,06 Da) e formaldeído pesado (+ 36.07 Da); metilação dos N-Terminais; conversão Glu > pyro-Glu nos N-Terminais e em resíduos de ácido glutâmico/glutamina N-terminal; acetilação do N-Terminal (+42,01 Da). Nenhuma modificação variável foi incluída. Os resultados do MS-GF+ foram validados pelo OpenMS com um nível de confiança acima de 95%. A quantificação relativa para cada peptídeo foi calculada por meio do ferramenta *FeatureFinderMultiplex* (112), como parte do OpenMS.

## **3.12 Análise bioinformática**

### **3.12.1 Normalização dos dados e análise pareada (teste-t)**

Os valores de intensidade/área dos picos correspondentes aos peptídeos marcados com formaldeído leve e pesado foram transformados tomando-se o logaritmo na base 2  $\log_2$  e, em seguida, submetidos à normalização por quantis, utilizando a biblioteca 'proprocessCore', disponível na plataforma R. Identificações oriundas de apenas uma versão (leve/pesado) peptídica não foram consideradas para análises subsequentes. A biblioteca 'limma' presente na plataforma R/Bioconductor foi utilizada para a análise comparativa entre as situações experimentais (113). A comparação das médias entre pares de situações experimentais (linhagens celulares) foi realizada utilizando-se um teste t (*Bayes-moderated*) no qual os *P*-valores foram corrigidos para testes múltiplos com o



método Benajmini-Hochberg. As proteínas cujos p-valores ajustados foram  $\leq 0.05$  e  $\log_2(\text{fold change}) > 1$  e  $< -1$  foram consideradas como diferencialmente expressas.

A reprodutibilidade entre as situações experimentais (replicatas biológicas) foi avaliada na plataforma R, utilizando-se avaliando-se a correlação de Pearson como medida (entre os valores quantitativos referentes às replicatas biológicas).

### **3.12.2 Soft clustering, enriquecimento de categorias do Gene Ontology (GO) e heatmaps**

Para a análise dos dados de expressão relativa entre as linhagens humanas, após normalização (descrita anteriormente) os valores de intensidade foram transformados em *z-score* e agrupados conforme expressão relativa, utilizando a biblioteca 'mfuzz', na plataforma R. As proteínas presentes em cada *cluster* foram manualmente anotadas, de acordo com as informações associadas às suas principais funções presentes nas categorias presentes no Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>) (GO – *molecular function* ou GO-*biological process*). Nos casos em que não foram verificadas anotações, as entradas foram submetidas à busca por homologia utilizando-se o software Blast2GO (114) e selecionando a entrada homóloga cujo *e-value* fosse  $\leq 10^{-3}$ . A lista de proteínas presentes em cada *cluster* foi avaliada quanto ao enriquecimento de categorias GO (*biological process*), vias biológicas (*KEGG pathways*) e quanto à possíveis grupos de interações proteicas utilizando-se o programa STRING (115), utilizando apenas p-valores ajustados  $\leq 0.05$ .

Os valores de expressão (*LFQ intensities*) para as proteínas identificadas nas amostras de pacientes com melanoma (item 3.10.1), foram normalizados, conforme descrito anteriormente (item 3.11.1), agrupados e visualizados na forma de *heatmaps* utilizando a biblioteca 'pheatmap' na plataforma R.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das linhagens celulares

A caracterização das linhagens celulares foi avaliada a partir da curva de crescimento (Anexo II) e derivações específicas foram calculadas, como o tempo de dobramento, a quantidade de dobramentos e a densidade de saturação, conforme apresentado na Tabela 8. Os efeitos do carenciamento (remoção do SFB) também foram avaliados e representados na mesma tabela.

**Tabela 8** - Caracterização das linhagens em estudo.

Linhagem celular	Passagem n°.	Tempo de dobramento (horas) <sup>1</sup>	Quantidade de dobramentos <sup>2</sup>	Densidade de saturação <sup>3</sup>	Tempo de aderência <sup>4</sup>	Proliferação <sup>5</sup> (%)	Viabilidade Tripán <sup>6</sup> (%)
Hs 895.Sk	25	52,22 ± 0,18	3,92	275,65 x e <sup>4</sup>	48	81,6	95,1
Hs 895.T	26	35,27 ± 1,45	5,36	352,73 x e <sup>4</sup>	48	79,9	95,3
A375	177	26,95 ± 6,95	6,3	253 x e <sup>4</sup>	48	54	96,3
SH4	35	31,05 ± 1,15	5,8	382 x e <sup>4</sup>	48	79,7	97,15
Melan A	32	26,5 ± 0,59	4,52	272 x e <sup>4</sup>	48	46,7	97,8
Tm1	27	20,7 ± 5,46	5,46	323 x e <sup>4</sup>	48	86,5%	97,5

<sup>1</sup> Tempo em horas em que a população de células dobra de concentração.

<sup>2</sup> Quantidade de dobramentos durante a fase exponencial.

<sup>3</sup> Densidade de saturação na fase estacionária (e<sup>4</sup> = 10<sup>4</sup>).

<sup>4</sup> Tempo em horas em que as células permaneceram aderidas em cultura, na ausência de soro fetal bovino (SFB).

<sup>5</sup> Percentual de proliferação de células carenciadas em relação a proliferação de células cultivadas na presença de SFB 10%.

<sup>6</sup> Percentual médio de células viáveis em cultura carenciada (mensurado após 24h de remoção do SFB).

De forma geral, todas as linhagens tumorais apresentaram tempo de dobramento menores do que aquele verificado para as linhagens normais (fibroblastos dermais, Hs 895 Sk, e melanócitos murinos, Melan-a). Todas as linhagens permaneceram viáveis após 24h de remoção do SFB; contudo a proliferação celular mostrou-se afetada nas diferentes linhagens.

#### 4.2 Quantificação proteica nos secretomas celulares

A quantificação de proteínas presentes nos secretomas de todas as linhagens celulares foi realizada em triplicata e variou entre 0,7 a 5,59 mg/mL para as diferentes linhagens analisadas (Tabela 9). Para algumas linhagens foi necessário um número maior de garrafas de cultivo no intuito de se obter concentrações proteicas compatíveis com as análises proteômicas subsequentes.

**Tabela 9** - Concentração proteica nos secretomas celulares

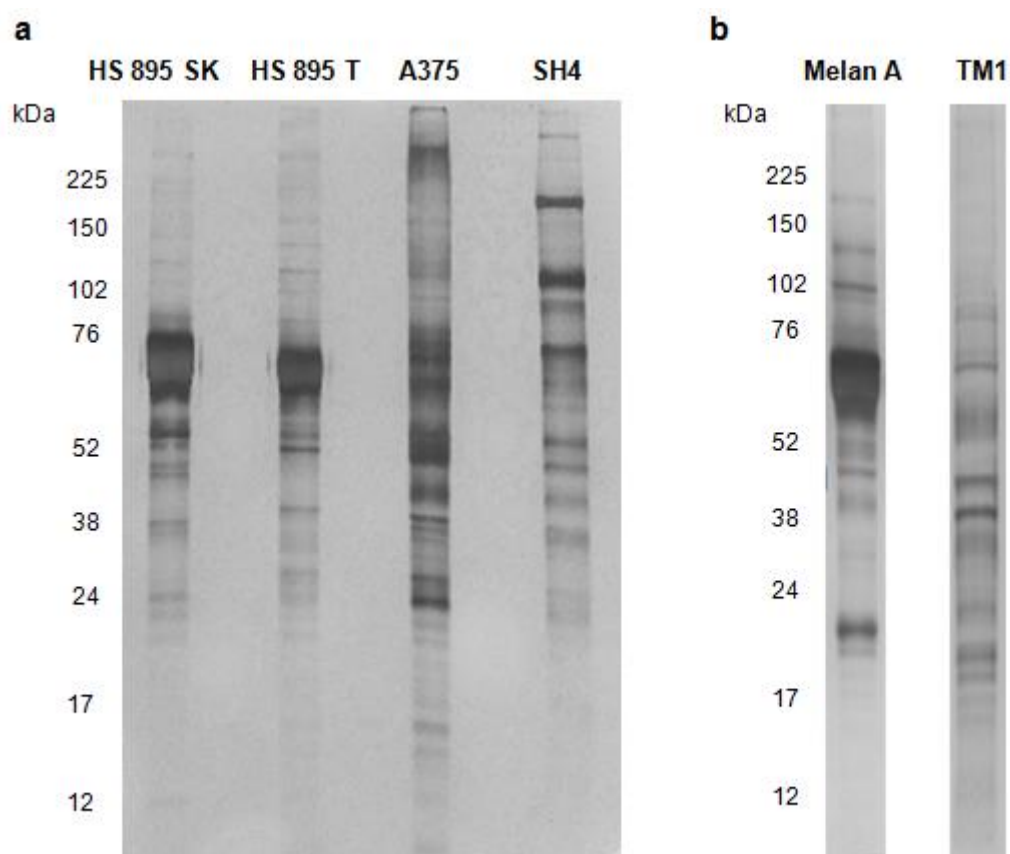
Linhagem celular	Replicata	N° de garrafas de cultivo	Quantitativo proteico (mg/mL)
Hs 895. Sk	1	18 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	1,212
	2	18 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	0,777
	3	18 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	1,162
Hs 895. T	1	14 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	0,903
A375	1	14 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	2,576
	2	14 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	2,480
	3	14 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	2,641
SH4	1	10 garrafas T175 cm <sup>2</sup> + 5 garrafas T150 cm <sup>2</sup>	1,132
	2	10 garrafas T175 cm <sup>2</sup> + 5 garrafas T150 cm <sup>2</sup>	1,281
	3	10 garrafas T175 cm <sup>2</sup> + 5 garrafas T150 cm <sup>2</sup>	1,389
Melan A	1	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	3,03
	2	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	3,02
	3	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	2,72
TM1	1	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	3,26
	2	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	3,74
	3	15 garrafas T175 cm <sup>2</sup>	5,59

As linhagens tumorais apresentaram maior concentração proteica no secretoma em comparação com a linhagem normal (Hs 895. Sk), já para a melan-a característica o que pode ter resultado em um maior diversidade na análise do perfil eletroforético dessas linhagens (Figura 11).

#### 4.3 Perfil eletroforético dos secretomas em gel de SDS-poliacrilamida

Para visualização qualitativa da complexidade proteica dos secretomas celulares, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, conforme apresentado na Figura 11. O perfil proteico dos secretomas mostrou-se variável entre as linhagens de estudo, com proteínas de massa molecular

concentradas na faixa de 225- 10 kDa nas linhagens metastáticas humanas e predominantemente de 80-20kDa para os fibroblastos. Nas linhagens murinas foi observado uma concentração de proteínas na faixa de 100-40 kDa para os melanócitos normais e um perfil mais disperso (variando de 100-17 kDa) para o secretoma da linhagem tumoral (Tm1).

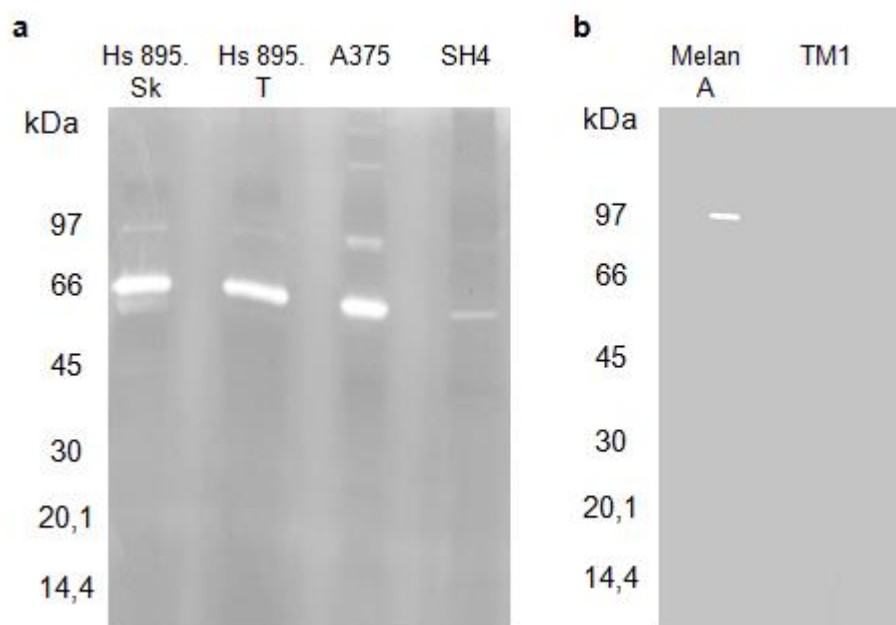


**Figura 11** - Perfil eletroforético dos secretomas. (a) Perfil proteico das proteínas dos secretomas das linhagens celulares humanas (3 µg de proteínas) em gel de SDS- poliacrilamida 12%. (b) Perfil proteico das proteínas dos secretomas das linhagens murinas (3 µg de proteínas). Os marcadores de massa molecular estão indicados à esquerda das figuras. As proteínas foram coradas com nitrato de prata conforme protocolo descrito por (102).

#### 4.4 Zimografia

A atividade proteolítica dos secretomas das linhagens celulares foi avaliada pela técnica de zimografia em que foi utilizado um substrato (gelatina) incorporado ao gel de SDS – poliacrilamida (Figura 12). Com exceção do secretoma da linhagem murina tumoral, foi verificada atividade gelatinolítica no secretoma de todas as

demais linhagens de estudo. Esta atividade concentrou-se na região de 97 a 66 kDa, provavelmente resultado da atividade de metaloproteases de matriz, como a collagenase MMP-2 (116).

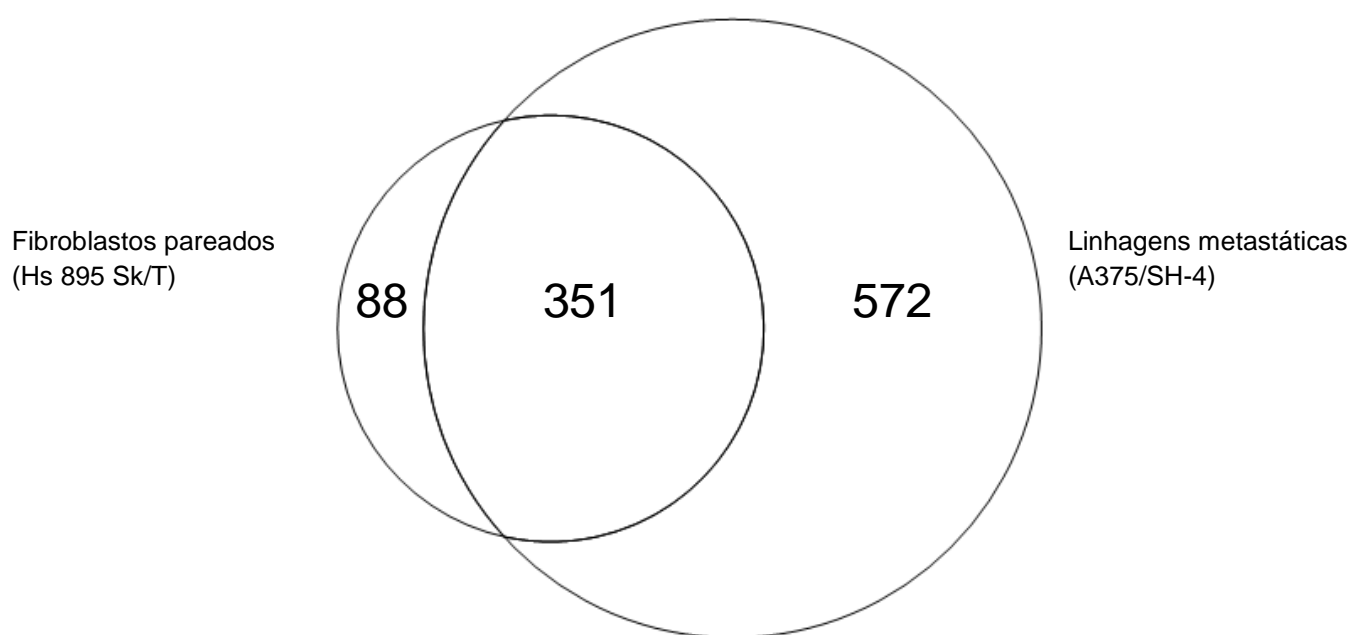


**Figura 12** – Avaliação da atividade proteolítica por zimografia (5 µg de proteínas). (a) Linhagens humanas (b) Linhagens murinas. As proteínas foram coradas com *Comassie Brilliant Blue G-250*.

## 4.5 Análise proteômica (shotgun) dos secretomas celulares

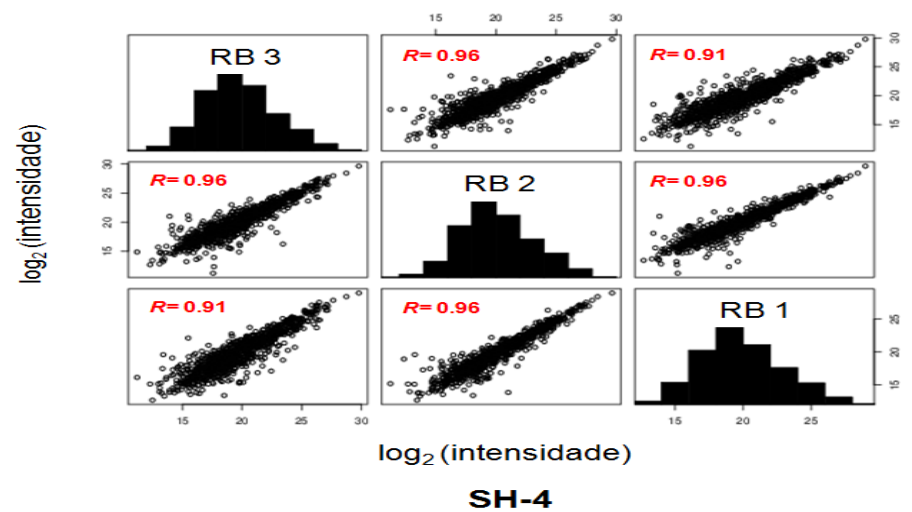
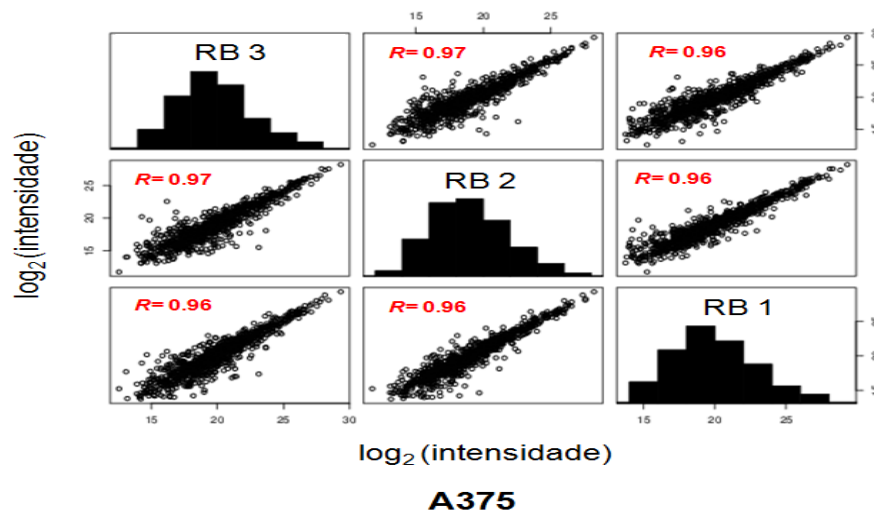
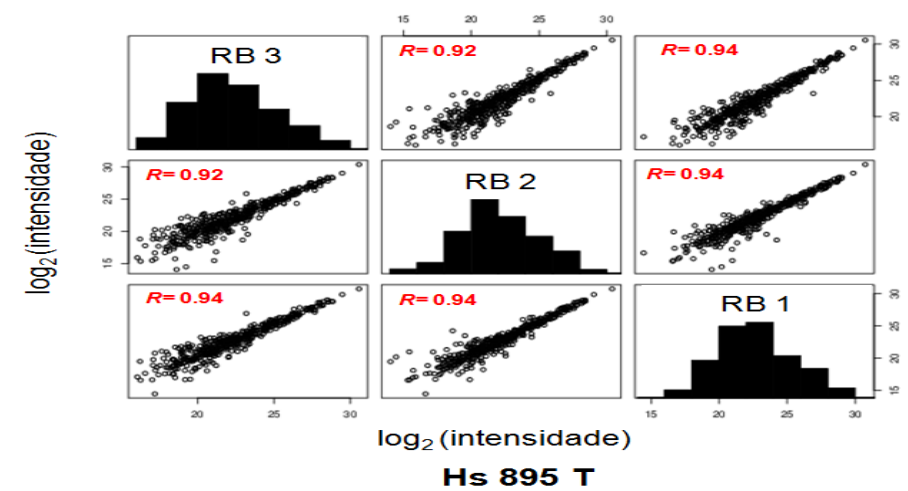
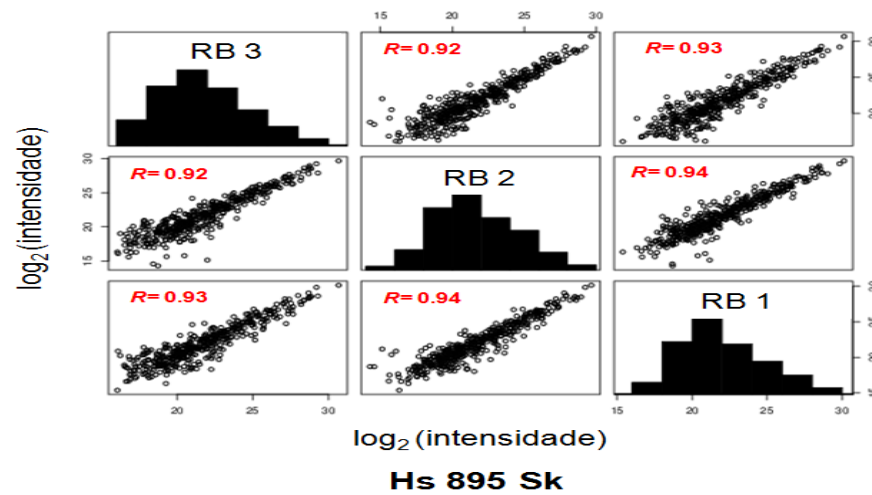
### 4.5.1 Identificações proteicas e correlação entre as replicatas biológicas

Após a exclusão de identificações em que foi possível observar valores de intensidade em apenas uma condição (leve ou pesado), a análise dos secretomas das linhagens celulares resultou na identificação de 1.011 proteínas (439 proteínas presentes nos secretomas dos fibroblastos Hs 895 Sk e Hs 895 T e 923 proteínas nos secretomas das células metastáticas A375 e SH4, sendo 351 proteínas comuns entre os conjuntos pareados, conforme representado na Figura 13).



**Figura 13** - Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas (e compartilhadas) na análise comparativa dos secretomas celulares.

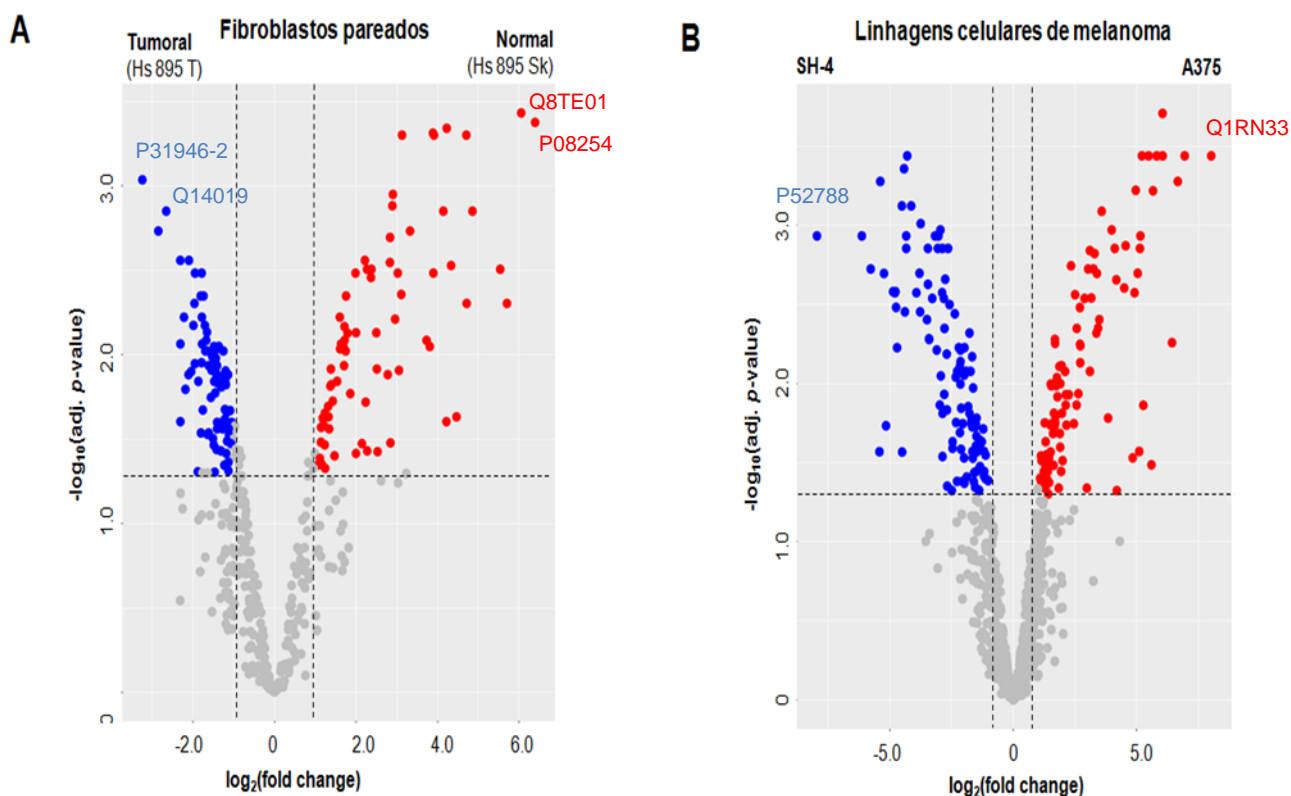
A análise de correlação entre as replicatas biológicas (valores de intensidade das marcações com formaldeído leve e pesado referente às proteínas identificadas), avaliada por meio do coeficiente de Pearson, resultou em valores que variaram entre 0,92 e 0,97, conforme apresentado na Figura 14.



**Figura 14** - Reprodutibilidade da quantificação proteica entre as replicatas biológicas (RB) das linhagens Hs 895 Sk, Hs 895 T, A375 e SH-4. Valores logaritmizados (base 2) para as intensidades leve ou pesada (Eixo x) encontradas para cada proteína mensurada nas três replicatas biológicas (a única exceção foi o secretoma da linhagem Hs 895T, para o qual não dispúnhamos de 3 replicatas biológicas; a correlação apresentada, portanto foi avaliada entre as replicatas técnicas).

#### 4.5.2 Expressão diferencial - análise proteômica quantitativa entre as linhagens celulares

A dimetilação isotópica redutiva permitiu a quantificação das proteínas diferencialmente expressas entre os fibroblastos normais e tumorais, bem como entre as linhagens metastáticas A375 e SH-4, conforme apresentado na figura 15.



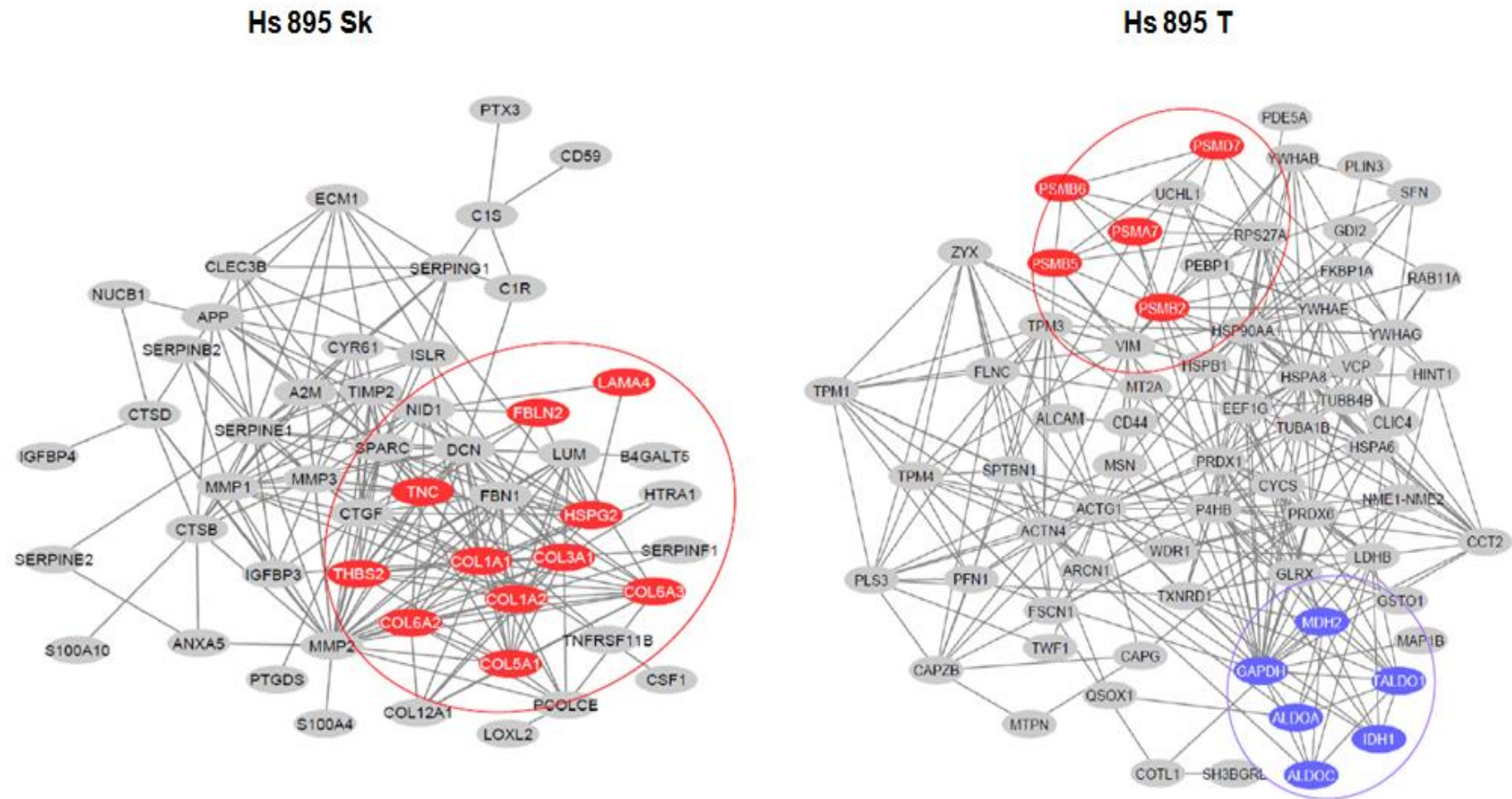
**Figura 15** - *Volcano plot* apresentando as proteínas secretadas diferencialmente expressas nos secretomas analisados. Comparação entre as linhagens de fibroblastos pareados (A) e entre as linhagens metastáticas (B). Em azul as proteínas consideradas diferencialmente abundantes no secretoma da linhagem Hs 895T e SH-4 e em vermelho as proteínas diferencialmente abundantes no secretoma das linhagens (P- valor ajustado  $\leq 0.05$  e  $\log_2(\text{fold change}) > 1$  e  $< -1$  foram consideradas como diferencialmente abundantes). As proteínas com  $\log_2(\text{fold change})$  mais negativo ou positivo estão discriminados no gráfico.

Aproximadamente 23% das proteínas identificadas nas linhagens A375 e SH4 apresentaram expressão diferenciada (209 proteínas no total; 97 presentes na A375 e 112 na SH4). Na comparação entre os fibroblastos (Hs 895 Sk e Hs 895 T), 38% das proteínas identificadas foram diferencialmente expressas (439 proteínas no total; 74 na linhagem normal e 80 presentes na tumoral. Este é o caso das proteínas



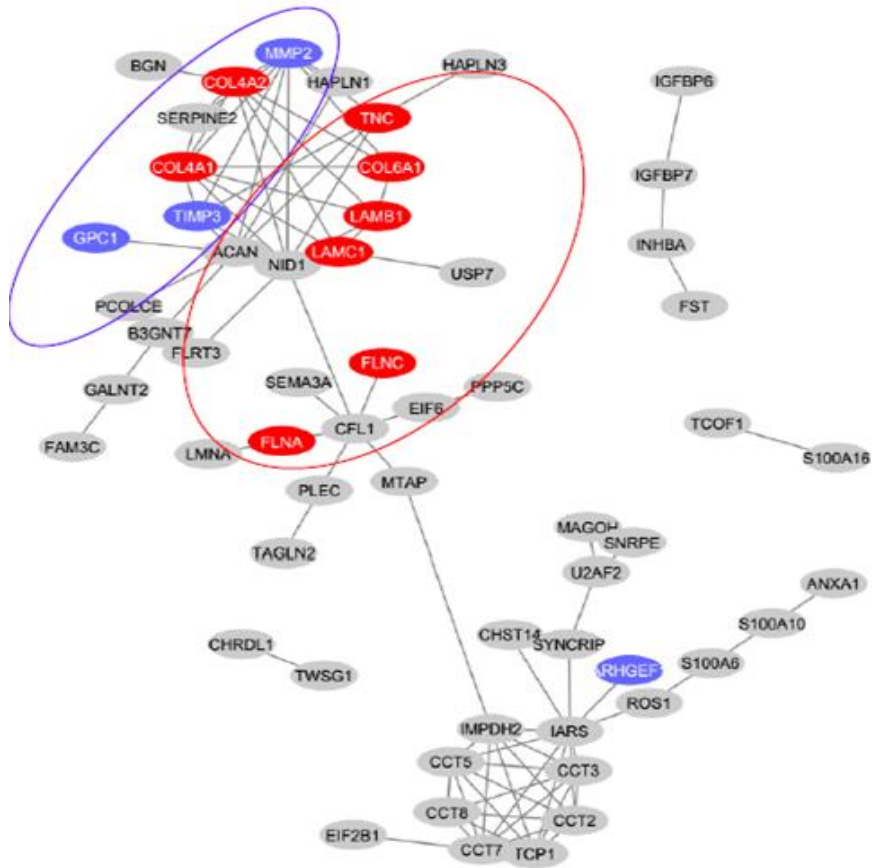
P31946-2 (Protein kinase C inhibitor protein 1) e Q8TE01 (Dermal papilla derived protein 12), mais expressas no secretoma das linhagens tumoral e normal, respectivamente, bem como as proteínas P52788 (Spermine synthase) e Q1RN33 (Melanoma antigen A 4), mais expressas nas linhagens SH4 e A375.

Selecionamos as proteínas consideradas diferencialmente abundantes entre os secretomas para avaliar *in silico*, por uma abordagem bioinformática, a possibilidade de interação entre elas e inferir aspectos funcionais a partir desta análise por meio da subsequente análise de enriquecimento de vias biológicas, ambas realizadas na plataforma STRING. A análise da interação entre as proteínas diferencialmente expressas nos secretomas avaliados revelou diferentes interactomas de proteínas (Figuras 18 e 19). A análise de redes de interação para as proteínas significativamente abundantes nos fibroblastos dermais normais (Hs 895 Sk) revelou grupos altamente conectados e funcionalmente relacionados a componentes estruturais como proteínas de matriz extracelular e adesão focal. Para os fibroblastos associados ao câncer (Hs 895 T), foram verificados grupos funcionalmente relacionados com degradação proteica e biossíntese de aminoácidos (Figura 18). A análise da rede de interação entre as proteínas diferencialmente abundantes presente nos secretomas das linhagens metastáticas A375 e SH-4 revelou grupos de proteínas funcionalmente relacionadas ao processo metastático, tais como enzimas proteolíticas e enzimas associadas com a degradação de glicosaminoglicanos, além de enzimas lisossomais como as catepsinas (Figura 16 e 17).

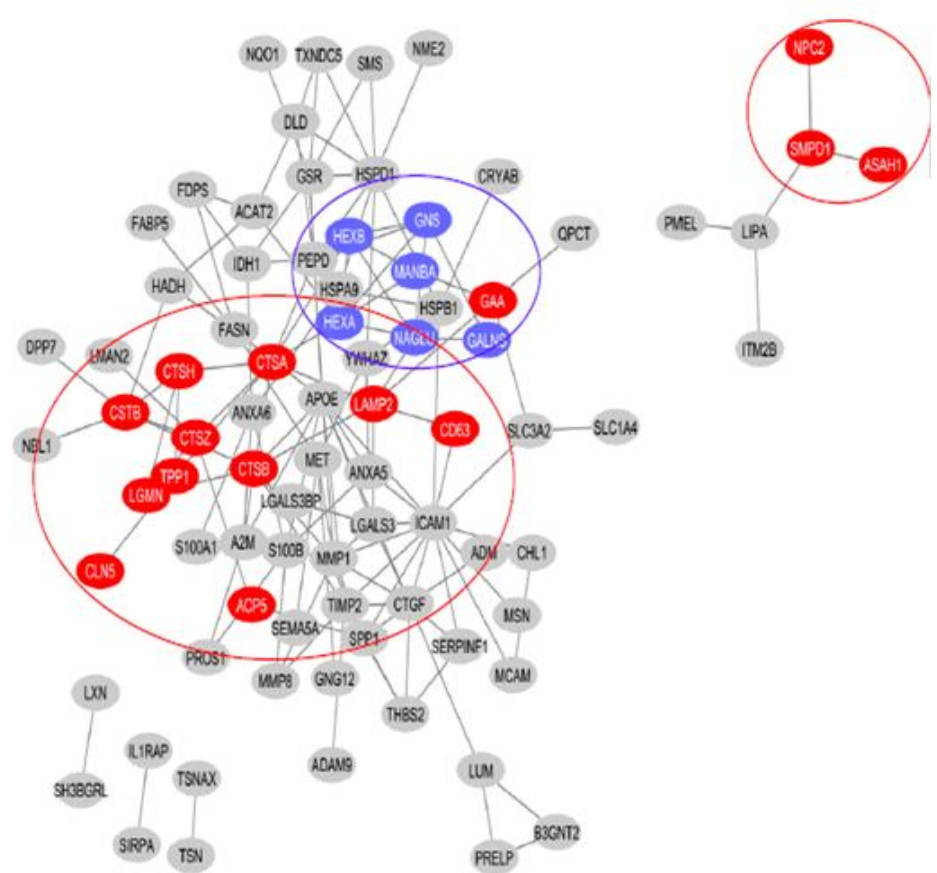


**Figura 16** – Redes de interação proteína-proteína (obtidas por meio da análise com o programa STRING) avaliadas para as proteínas diferencialmente abundantes nos secretomas dos fibroblastos Hs 895 Sk e Hs 895 T. Grupos funcionalmente relacionados estão destacados pelas cores: vermelho (proteínas estruturais de matriz extracelular e relacionadas com adesão focal; Hs895 Sk) e proteínas relacionadas com degradação proteica (Hs 895T) roxo: proteínas relacionadas com metabolismo energético e biossíntese de aminoácidos.

**A375**



## SH4



**Figura 17** - Redes de interação proteína-proteína (obtidas por meio da análise com o programa STRING) avaliadas para as proteínas diferencialmente abundantes nos secretomas das linhagens A375 e SH-4. Grupos funcionalmente relacionados estão destacados pelas cores: vermelho (linhagem A375 - proteínas relacionadas à matriz extracelular e de interação com receptores de matriz extracelular; linhagem SH-4 enzimas lisossomais) roxo: (linhagem A375 - proteoglicanos relacionados a processos metastáticos e enzimas proteolíticas; linhagem SH-4 proteínas relacionadas com a degradação de glicosaminoglicanos).

#### **4.5.3 Assinaturas de expressão proteica nos secretomas das linhagens celulares – *soft clustering* e *anotação funcional***

Após normalização dos dados e transformação ( $\log_2$ ) dos valores de intensidade obtidos para cada proteína identificada, agrupamos os valores de expressão utilizando a biblioteca 'mfuzz' na plataforma R, conforme descrito no item (3.11.2). O intuito desta análise foi o de se verificar potenciais 'assinaturas' relacionadas ao perfil de expressão das proteínas presentes nos secretomas das 4 linhagens avaliadas. Esta análise foi realizada apenas com as proteínas (461) que foram identificadas/quantificadas concomitantemente nos secretomas das 4 linhagens celulares. De acordo com os parâmetros utilizados, foi possível observar 6 clusters nos quais os perfis de expressão apresentavam tendências similares (ie. valores de expressão similares para cada secretoma avaliado) (Figura 18). Com o objetivo de se obter maiores informações acerca dos processos biológicos nos quais as proteínas de cada cluster estão envolvidas, selecionamos 3 clusters (clusters 2, 5 e 6) nos quais os perfis de expressão foram mais consistentes (ie. menor desvio entre as linhagens) e realizamos uma análise de enriquecimento de processos biológicos do *Gene Ontology* (Figura 19). Esta análise mostrou que processos biológicos como movimento celular estão enriquecidos nos secretomas dos fibroblastos (tanto dermais quanto associados ao melanoma; cluster 2). Por outro lado, proteínas relacionadas ao metabolismo de pequenas moléculas apresentaram maior expressão nos fibroblastos associados ao câncer e nas linhagens metastáticas (clusters 2 e 5). Proteínas relacionadas com processos catabólicos como o metabolismo de carboidratos e organização da estrutura extracelular apresentaram valores de expressão elevados nas linhagens metastáticas (cluster 6).



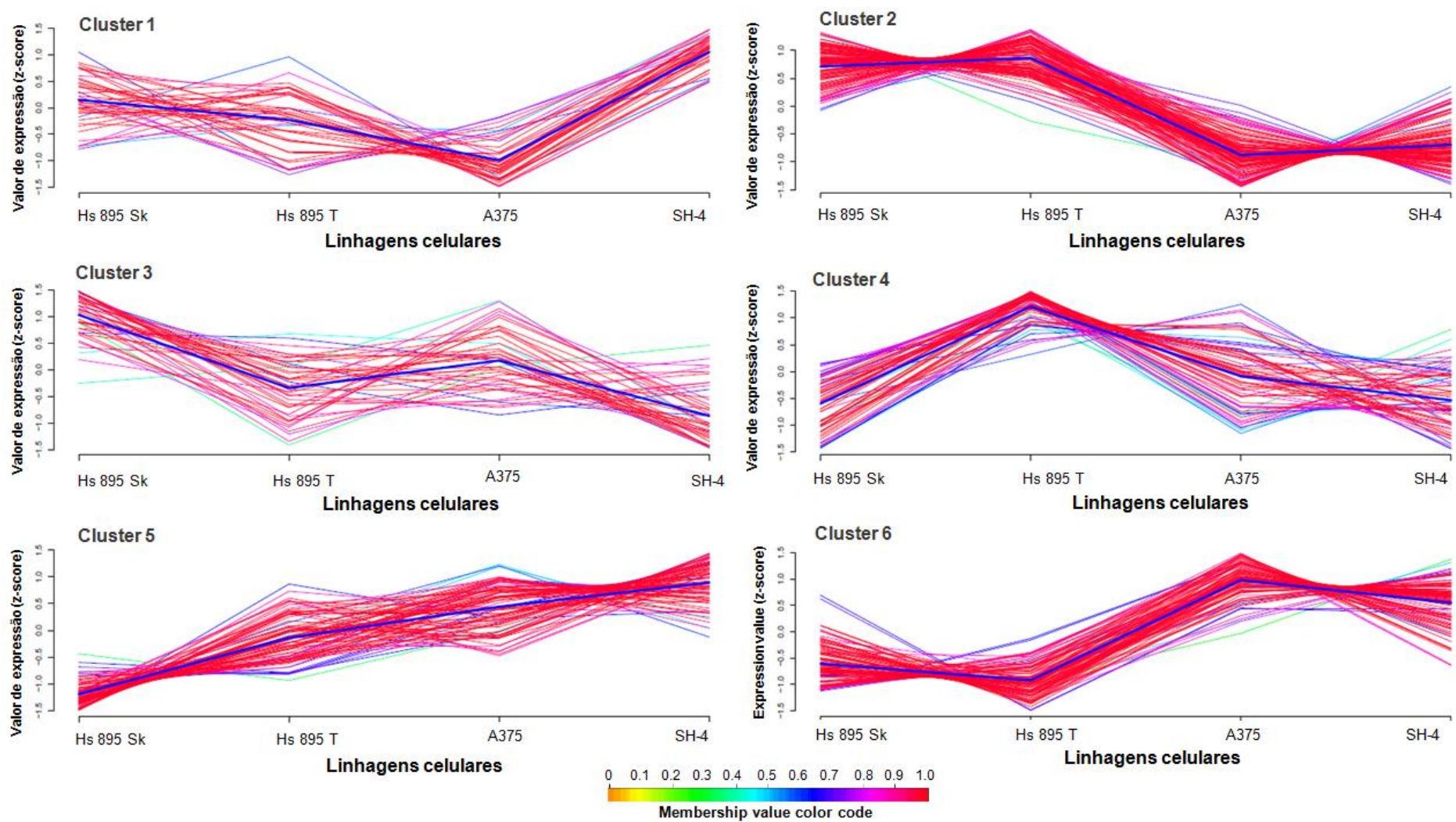
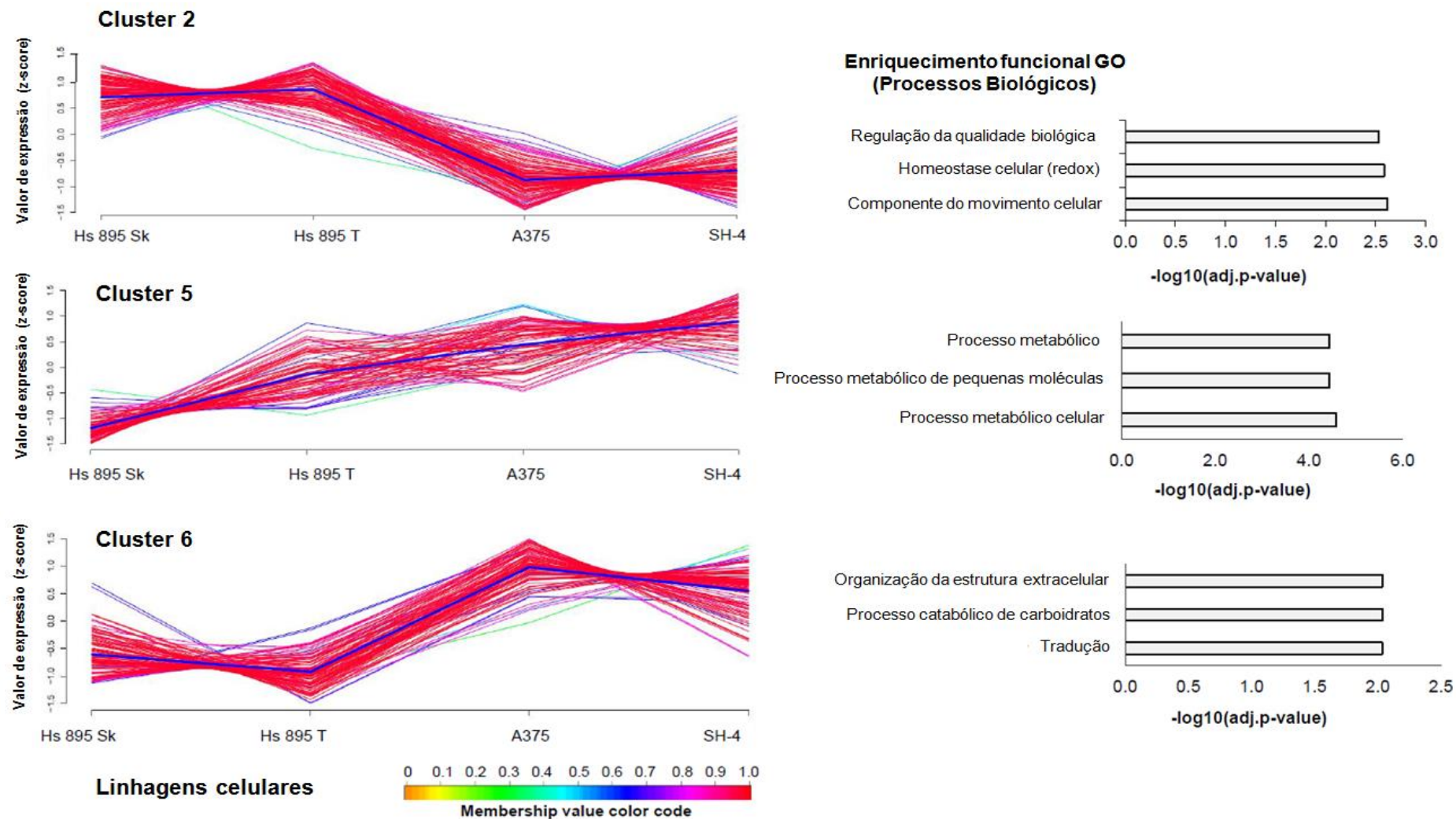


Figura 18- Clusterização das 461 proteínas compartilhadas entre as replicatas biológicas de todas as linhagens celulares.

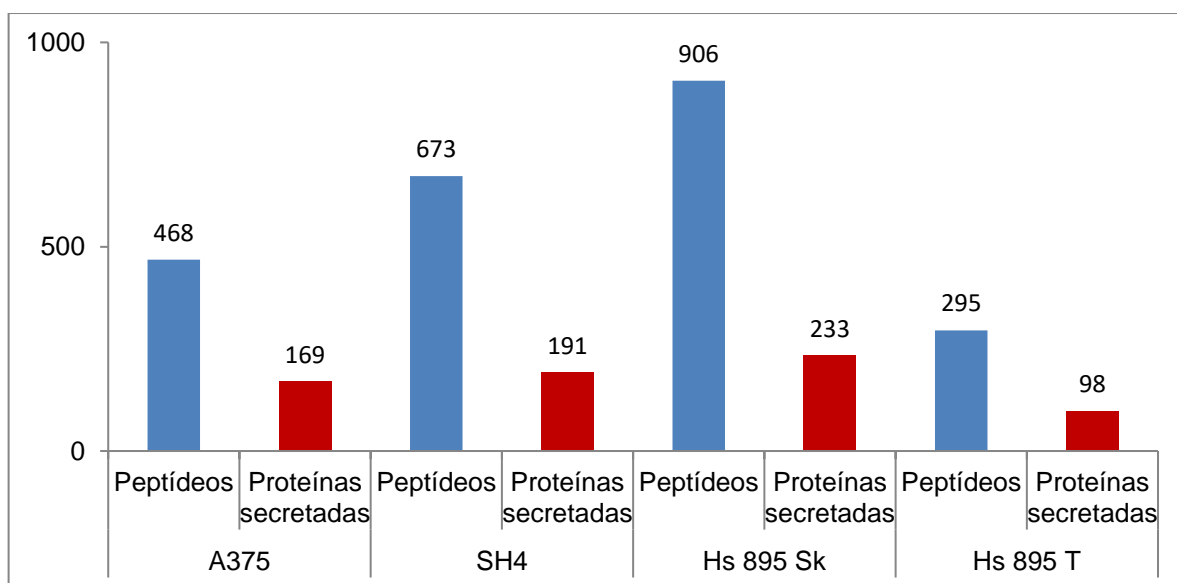


**Figura 19** - Assinaturas de expressão proteica relacionadas aos secretomas das 4 linhagens de estudo. Clusters selecionados para análise de enriquecimento funcional (Gene Ontology GO; *Biological process*). No intuito de selecionar padrões de expressão mais consistentes entre as análises, apenas proteínas com *membership value*\*  $\geq 0.7$  de cada cluster foram selecionadas para análise de enriquecimento funcional (\* o membership value é uma medida do quanto o padrão de expressão é concordante com os demais padrões dentro de um mesmo cluster).

## 4.6 Análise do N-terminoma das proteínas presentes no secretomas celulares

### 4.6.1 Identificações proteicas/ peptídicas e modificações químicas N-terminais

Após o ensaio de marcação e enriquecimento seletivo de N-terminais (TAILS) optamos por proceder com as análises subsequentes utilizando apenas as proteínas secretadas classicamente (ie. proteínas cuja anotação apresentasse peptídeo sinal), excluindo , portanto, proteínas cuja anotação apresentasse localização intracelular. Foi possível observar um número variável de proteínas presentes nos secretomas das linhagens celulares, conforme apresentado na Figura 20.

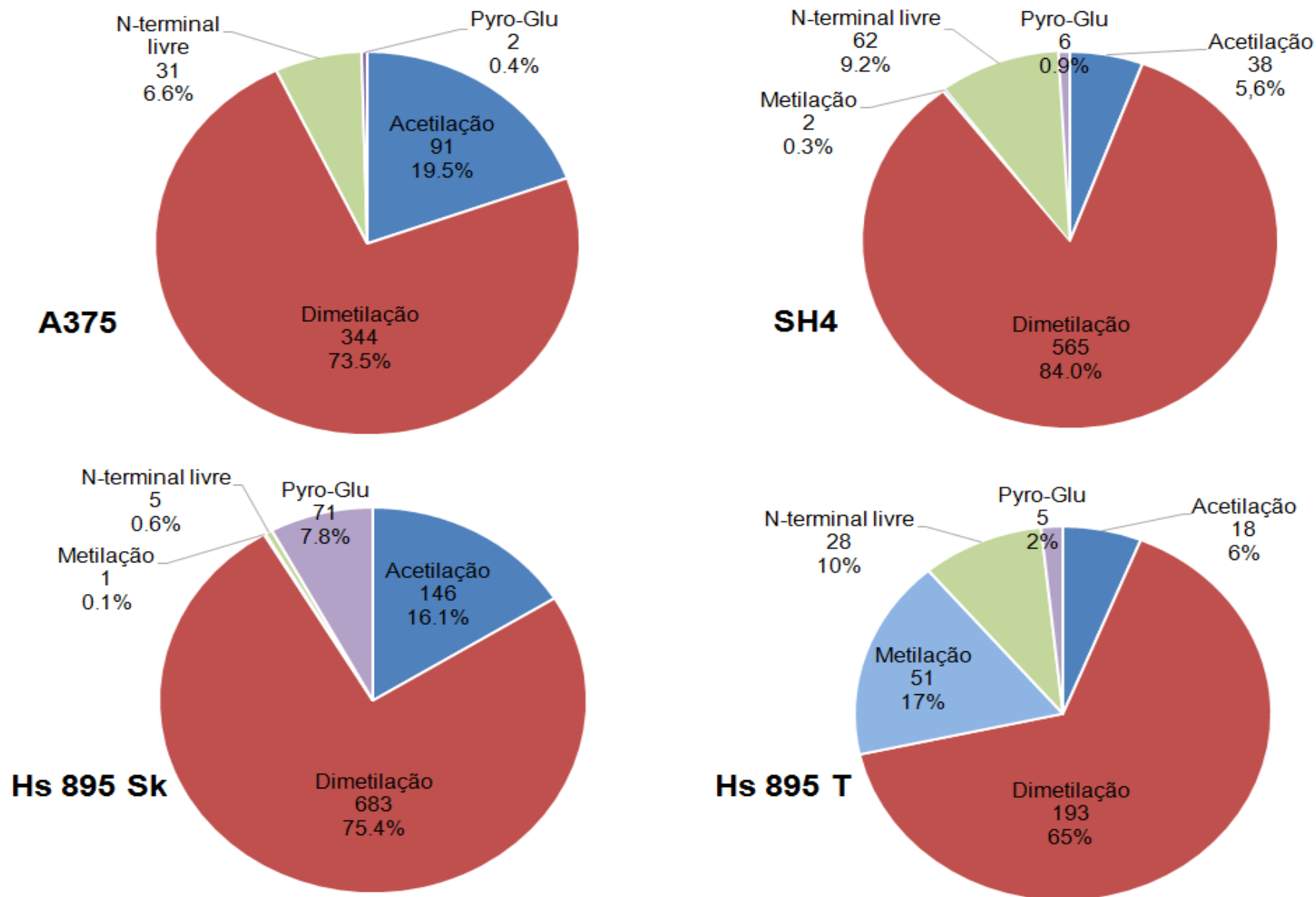


**Figura 20** – Perfil de identificação de peptídeos/proteínas nos secretomas celulares após procedimento TAILS. O número de peptídeos identificados está apresentado acima das barras azuis e o número de proteínas (das quais derivam-se os peptídeos) está apresentado acima das barras vermelhas. O perfil apresentado corresponde à combinação dos dados de 2 replicatas biológicas.

De posse dos dados referentes aos peptídeos obtidos após análise por TAILS, foi possível observar modificações químicas presentes nos N-terminais dos peptídeos identificados (Figura 21), bem como avaliar a proporção destas modificações entre os peptídeos dos diferentes secretomas. De forma geral, para todas as linhagens, identificamos uma grande proporção de N-terminais não bloqueados (livres ou

quimicamente dimetilados – decorrentes do protocolo TAILS), bem como uma proporção variável de modificações químicas recorrentes em proteínas secretadas, como acetilação, metilação e ciclicação de resíduos N-terminais de glutamato ou glutamina em ácido piroglutâmico.

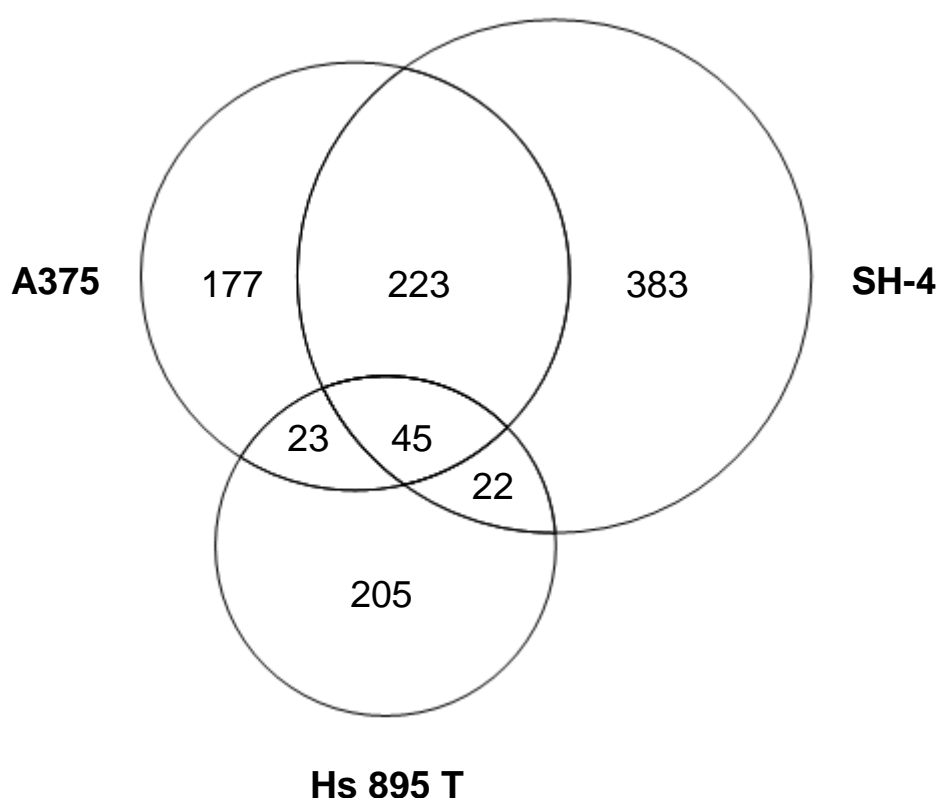




**Figura 21** – Modificações químicas presents no N-terminal dos peptídeos referentes às proteínas secretadas.

#### 4.6.2 Perfil comparativo do processamento N-terminal entre nos secretomas das linhagens celulares

Com objetivo de se evidenciar um padrão recorrente de processamento N-terminal presente nos secretomas celulares avaliados, foi realizada uma análise comparativa dos peptídeos identificados por TAILS nos secretomas tumorais (excluindo-se desta análise o secretoma da linhagem normal – Hs 895 Sk). Foram observados 45 peptídeos identificados concomitantemente nos secretomas das 3 linhagens tumorais, conforme apresentado na Figura 22.



**Figura 22** - Análise comparativa dos peptídeos identificadas após o procedimento TAILS nos secretomas das linhagens tumorais (A375, SH4, Hs895 T).

Os 45 peptídeos presentes nos secretomas das linhagens tumorais foram comparados com os peptídeos identificados na linhagem normal (Hs 895 Sk), sendo excluídos 3 peptídeos comuns entre todas as linhagens, resultando numa lista final de 42 peptídeos, exclusivamente encontrados nos secretomas das células tumorais.

#### 4.6.3 Anotação posicional dos N-terminais identificados nos secretomas das linhagens tumorais

Com o objetivo de se explorar informações referentes à anotação biológica e posicional dos 42 peptídeos identificados nos 3 secretomas tumorais, utilizamos a ferramenta bioinformática TopFINDER (109), (Tabela 10).

**Tabela 10** - Anotação posicional dos peptídeos obtidos pela análise de TAILS dos secretomas celulares (Hs 895T, SH-4 e A375).

Número de acesso (SwissProt)	Peptídeo	Proteína	Posição P1'	Nº de aa	Proteases*	Distância do peptídeo sinal
P01011	TSEAEIHQS FQHLLR	Alpha-1-antichymotrypsin	110	423		86
	EIGELYLPKFSISR	Alpha-1-antichymotrypsin	307	423		283
P04083	KGTDVNVFNTILTTR	Annexin A1	214	346		
P02654	TPDVSSALDKLKEFGNTLEDKAR	Apolipoprotein C-I	27	83		0
P27797	EPAVYFKEQFLDGDGWTSR	Calreticulin	18	417		0
P07858	RSRPSFHPLSDELVNYVNKR	Cathepsin B	18	339		0
Q96CG8	SEIPKGKQKAQLR	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	31	243		0
P01034	ALDFAVGEYNKASNDMYHSR	Cystatin-C	52	146		25
Q9UBQ6	ALLPSVKEDKMLMLR	Exostosin-like 2	38	330		
Q8IXL6	IALDLLPR	Extracellular serine/threonine protein kinase FAM20C	25	584		2
P09382	VLNLGKDSNNLCLHFNPR	Galectin-1	32	135		
Q08380	QSFQTPQHPSFLFQDKR	Galectin-3-binding protein	459	585		440
	TEASLADCKSLGWLKSNCR	Galectin-3-binding protein	96	585		77
	ELSEALGQIFDSQR	Galectin-3-binding protein	138	585		119
P06396	GLGLSYLSSHIANVER	Gelsolin	404	782	MEP1B;CASP1;CA SP7	376

	EGSEPDGFWEALGGKAAYR	Gelsolin	634	782		606
	LSYLSSHIANVER	Gelsolin	407	782	CASP1;CASP7	379
	VVEHPEFLKAGKEPGLQIWR	Gelsolin	53	782	MEP1A;MMP3	25
	MVVEHPEFLKAGKEPGLQIWR	Gelsolin	52	782	MEP1A;MMP3	24
Q16769	VSPSASAWPEEKNYHQPAILNSSALR	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	29	361		0
Q99988	SLARPQAPALHLR	Growth/differentiation factor 15	146	308		116
	LSLARPQAPALHLR	Growth/differentiation factor 15	145	308		115
Q16270	SSSDTCGPCEPASCPLPPLGCLLGETR	Insulin-like growth factor-binding protein 7	27	282		0
P01042	RPPGFSPFR	Kininogen-1	381	644	CAN2;CAN1;KLKB1;LCAP;ERAP2;KLK2;AMPE;AMPQ;HABP2;XPP1;XPP2;DPP2;PPCE;TPP1	362
P14174	SYSKLLCGLLAER	Macrophage migration inhibitory factor	75	115		
Q16674	GYFPSSIVR	Melanoma-derived growth regulatory protein	101	131		76
P01033	CTCVPPHPQTAFCONSGLVIR	Metalloproteinase inhibitor 1	24	207		0
	SGTHCLWTDQLLQGSEKGFQSR	Metalloproteinase inhibitor 1	164	207		140
	THCLWTDQLLQGSEKGFQSR	Metalloproteinase inhibitor 1	166	207		142
	KLQSGTHCLWTDQLLQGSEKGFQSR	Metalloproteinase inhibitor 1	161	207		137
Q9UJJ9	AKMKVVEEPNAFGVNNPFLPQASR	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma	25	305		0
O15240	LLQQGLAQVEAGR	Neurosecretory protein VGF	296	615		273
Q02818	LVTLEEFLASTQR	Nucleobindin-1	311	461	MEP1B	284
P62937	VSFELFADKVPKTAENFR	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	20	165	MEP1A	

Q10471	YYMYSGGGSALAGGAGGGAGR	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	21	571		
Q15113	VFDLELHPACR	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	81	449		55
Q9UHG2	AADHDVGSELPPEGVLGALLR	ProSAAS	221	260		187
P07602	GPVLGLKECTR	Prosaposin	17	524		0
P02768	KVPQVSTPTLVEVSR	Serum albumin	438	609		419
Q8TER0	AVALADFYPFGAER	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1	25	1413		0
P24821	AVDIPGLEAATPYR	Tenascin	1401	2201		1378
P01137	LSTCKTIDMELVKR	Transforming growth factor beta-1	30	390		0

#### Proteases\*

MEP1B: Meprin A subunit beta

CASP1: Caspase 1

CASP7: Caspase 7

MEP1A: Meprin A Subunit alpha

MMP3: Matrix Metalloproteinase – 3

CAN2: Calcium-dependent nuclease 2

CAN1: Calcium-dependent nuclease 1

KLKB1: Plasma Kallikrein

LCAP: Leucyl-cystinyl aminopeptidase

ERAP2: Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2

KLK2: Kallikrein – 2

AMPE: Aminopeptidase A

AMPQ: Aminopeptidase Q

HABP2: Hyaluronan-binding protein 2

XPP1: Xaa-Pro aminopeptidase 1

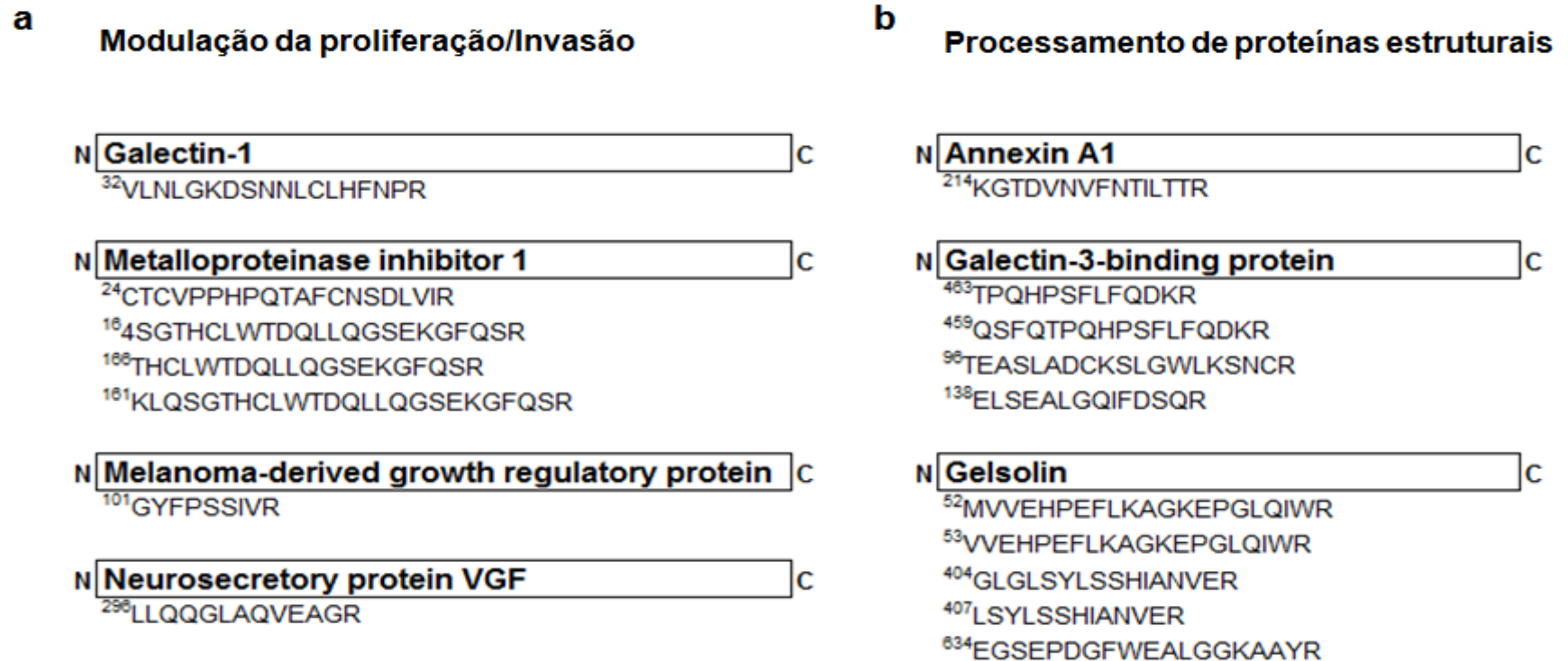
XPP2: Xaa-Pro Aminopeptidase 2

DPP2: Dipeptidyl peptidase 2

PPCE: Prolyl endopeptidase

TPP1: Tripeptidyl-peptidase 1

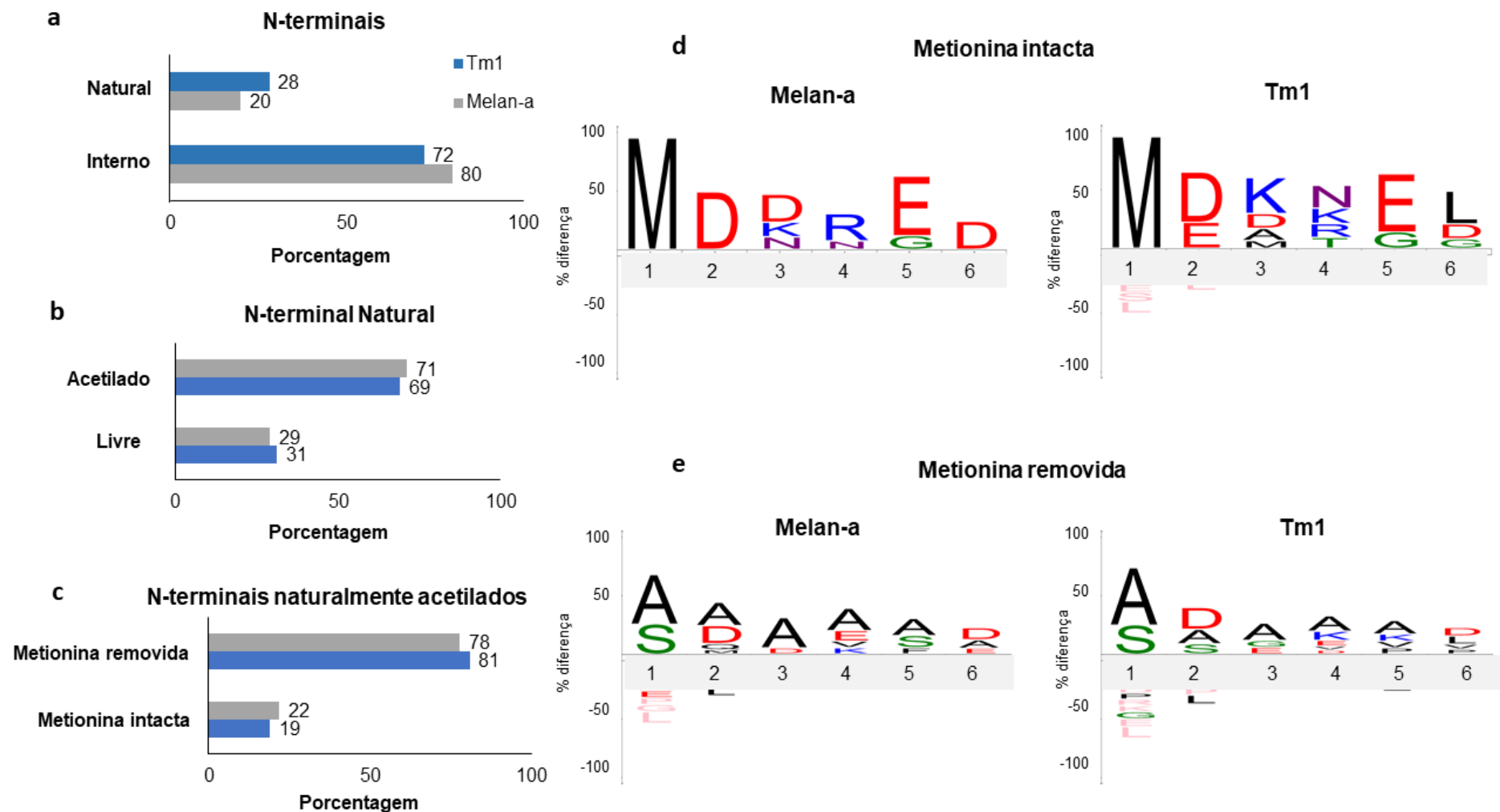
Dentre os peptídeos identificados na análise TopFINDER (Tabela 10) foi possível observar peptídeos gerados por processamento proteolítico, envolvidos em importantes processos relacionados a oncogênese, tais como modulação da proliferação celular, invasão e degradação de matriz extracelular, conforme apresentado na Figura 23.



**Figura 23** - Exemplos de eventos de processamento proteolítico identificados nos secretomas das linhagens tumorais. (a) Proteínas envolvidas na proliferação celular/invasão. (b) Proteínas estruturais de matriz extracelular. Os números correspondem à posição dos resíduos na estrutura primária da proteína madura. N e C correspondem às extremidades N e C-terminal dos peptídeos identificados.

#### **4.7 Análise N-terminômica (TAILS) dos secretomas celulares das linhagens pareadas murinas (MelanA e Tm1)**

A análise N-terminômica dos secretomas das linhagens murinas permitiu a identificação de 1044 peptídeos para a linhagem Melan-a e 1550 peptídeos para a linhagem Tm1. Não foram verificadas diferenças significativas quanto ao número de peptídeos correspondentes aos N-terminais naturais (ex. posição, 1, 2, 3 ou após peptídeo sinal ou pró-peptídeo) nem no número de peptídeos internos nas proteínas identificadas entre as duas linhagens (Figura 24-a). Com relação a acetilação dos N-terminais naturais, a análise revelou padrões semelhantes entre as linhagens murinas (Figura 24-b), bem como no padrão de presença/ remoção da metionina inicial nos N-terminais acetilados naturalmente (Figura 24-c). A frequência de resíduos de aminoácidos presentes nos N-terminais naturais acetilados também revelou padrões semelhantes entre as linhagens, com predominância de alanina e serina na posição 1 para ambas as linhagens e pequenas diferenças nas posições entre 2 a 6 (Figura 24-d,e).



**Figura 24** - Análise comparativa entre os N-terminais das linhagens murinas Melan-a e Tm1. (a) Comparação entre os N-terminais Naturais e Internos. (b) Comparação entre os N-terminais acetilados e livres do grupo de N-terminais naturais. (c) Comparação entre N-terminais com resíduo de metionina removido ou intacto do grupo de N-terminais naturalmente acetilados. (d) Análise da frequência de resíduos de aminoácidos presentes nos N-terminais naturais acetilados com a metionina intacta e (e) com a metionina removida.

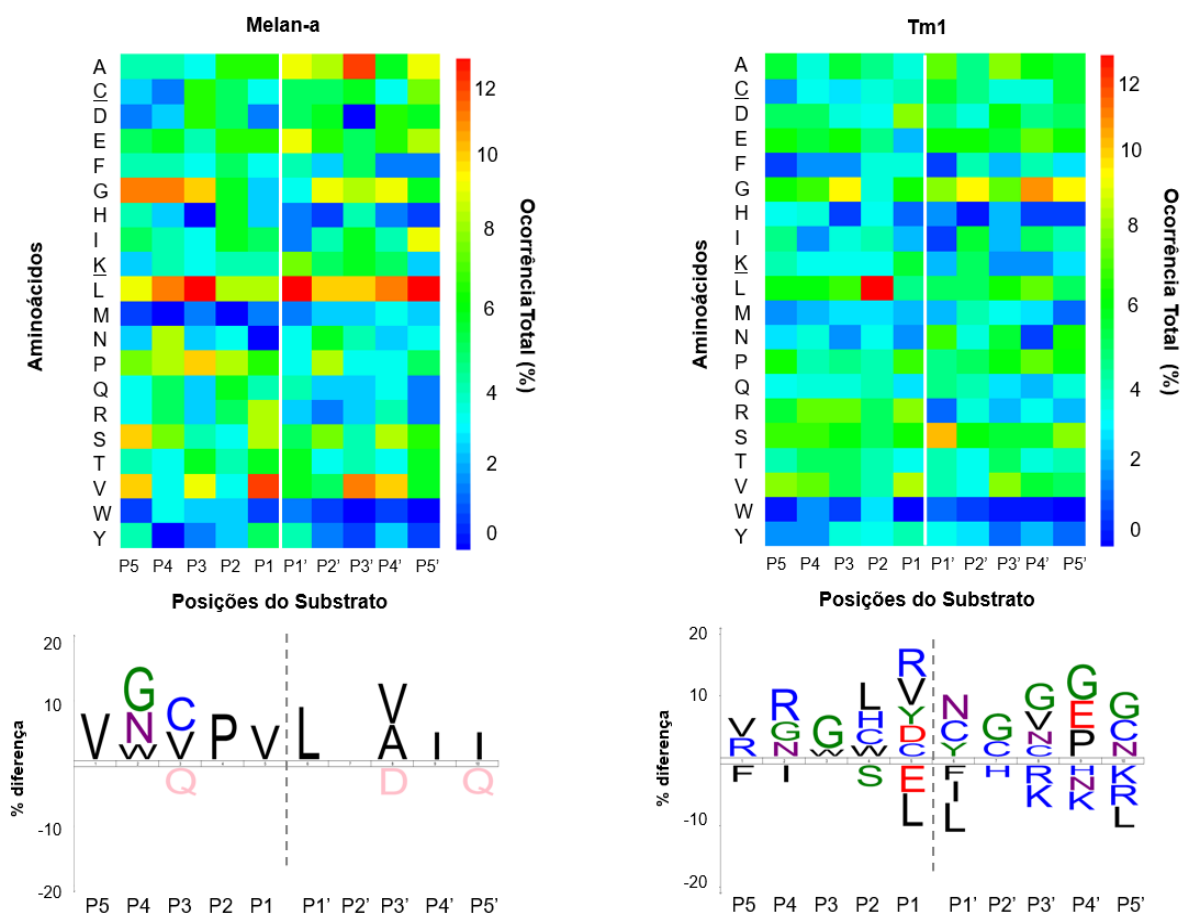


#### **4.7.1 Análise dos peptídeos internos**

A análise resultou em 706 peptídeos, correspondentes a 371 proteínas únicas, sendo 269 peptídeos únicos, secretados pela linhagem Tm1, e 117 secretados pela Melan-a. Em análise da anotação correspondente ao compartimento celular das proteínas identificadas, optamos por investigar os peptídeos correspondentes a proteínas cuja anotação no banco de dados UniProt indicavam localização extracelular e/ou presença de sinais canônicos de secreção (por exemplo, peptídeo sinal). Dos peptídeos internos gerados por processamento proteolítico, não mais do que 3%, continham informações, referentes ao processamento, anotadas no banco de dados TopFIND.

##### **4.7.1.2 Análise de possíveis sítios de clivagem nos peptídeos N-terminais identificados no secretoma das linhagens murinas**

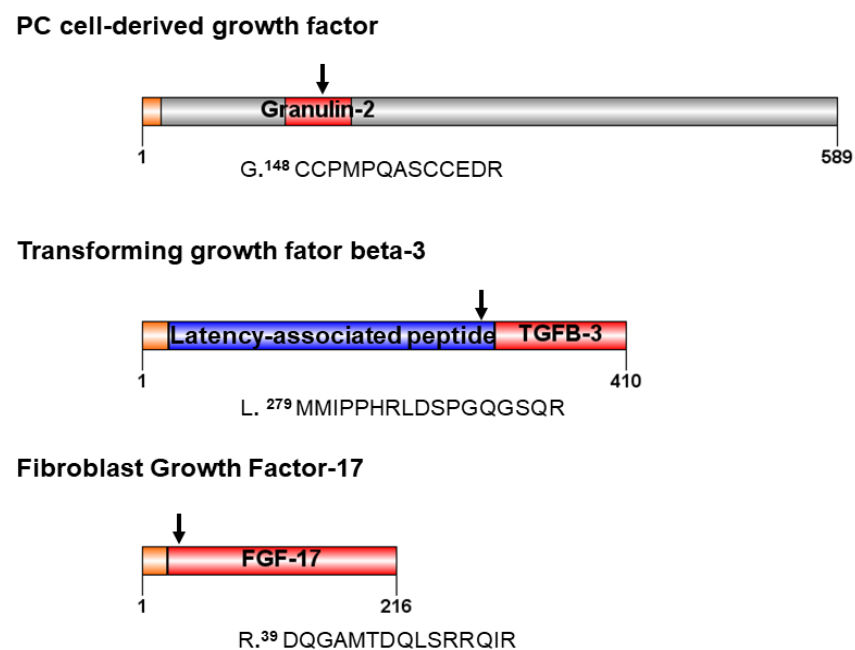
Com o objetivo de observar padrões de clivagem nas proteínas identificados nos secretomas das linhagens murinas, avaliamos as frequências dos resíduos de aminoácidos nas posições P5 a P5' (Figura 28). O mapeamento posicional dos peptídeos internos revelou na linhagem Melan-a, a presença de leucina na posição P1', valina e alanina na posição P3'. Resíduos de aminoácidos como a asparagina, cisteína e tirosina, mostraram-se mais abundantes na posição P1' da linhagem Tm1 e glicina, valina, asparagina e cisteína na posição P3' (Figura 25).



**Figura 25** – Frequência de aminoácidos nas posições P5-P5' nos peptídeos internos identificados nas proteínas secretadas pelas linhagens murinas Melan-a e Tm1 (A) e (B) *IceLogo* representando os resíduos de aminoácidos presentes nas posições P5-P5' nos peptídeos identificados. As frequências dos aminoácidos foram normalizadas de acordo com as suas abundâncias no banco de dados *Mus musculus* do UniProt. Aminoácidos na porção superior do logo de sequências representam resíduos cuja frequência no conjunto de dados foi maior do que aquela verificada no banco de dados (*Mus musculus*/UniProt).

#### 4.7.2 Ativação e processamento de fatores de crescimento

Dentre os peptídeos identificados na análise TopFINDER foi possível observar peptídeos gerados por processamento proteolítico, como fatores de crescimento envolvidos em importantes processos como a modulação da proliferação celular (Figura 26).

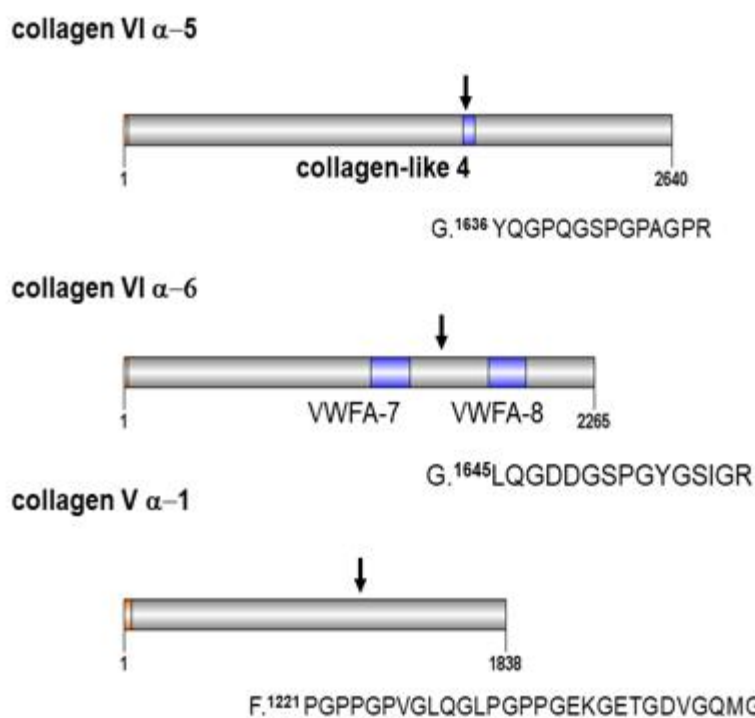


**Figura 26** - Análise do processamento de fatores de crescimento identificados no secretoma da linhagem Tm1.

Dentre os peptídeos identificados exclusivamente na linhagem tumoral (Tm-1), foi possível identificar fatores de crescimento processados em regiões específicas, que antecedem o sítio de ativação proteica, como no caso da TGFB-3, que foi processado no resíduo de número 279 na região do peptídeo de latência (Figura 29 b). O processamento do precursor das granulinas (possivelmente dando origem a uma forma alternativa da Granulina-2; clivagem ocorrida na posição 148,) e do FGF-17 logo após peptídeo sinal. Estas observações podem indicar a ativação ou inativação dos respectivos fatores de crescimento.

#### 4.7.3 Processamento de proteínas de matriz extracelular (Colágenos)

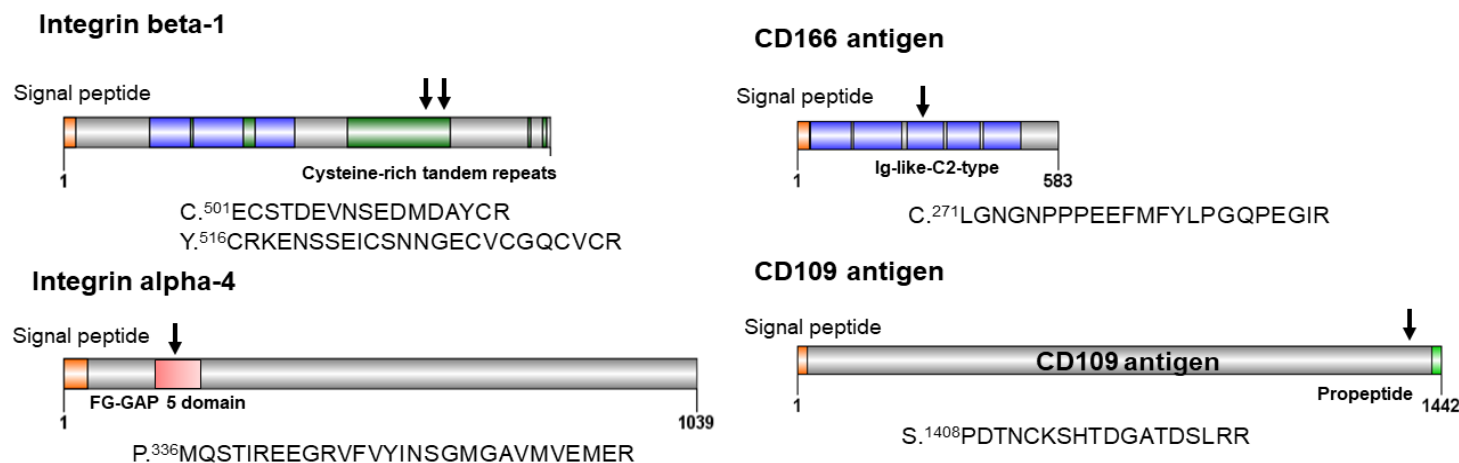
A análise do processamento do secretoma da linhagem tumoral (Tm1) revelou a possível degradação de proteínas que compõem a matriz extracelular, pela clivagem em regiões da proteína madura, como no colágeno VI  $\alpha$ -5 na posição 1638, collagen VI  $\alpha$ -6 e colágeno V  $\alpha$ -1, nas posições 1645 e 1221, respectivamente (Figura 27).



**Figura 27** - Análise do processamento de proteínas de matriz extracelular (Colágenos).

#### 4.7.3.1 “Shedding” de domínios ectópicos

A análise do processamento N-terminal de proteínas membranares da linhagem Tm1- revelou a clivagem de domínios extracelulares correspondentes (Figura 28). Identificamos a clivagem dos antígenos como T-cell surface antigen CD2 na posição 96, o CD166 antigen na posição 271, o CD109 antigen na posição 1408, a Integrina beta-1 em duas regiões distintas, como a posição 501 e 516, respectivamente à Integrin alpha-4 na posição 336, regiões extracelulares de proteínas de membrana.

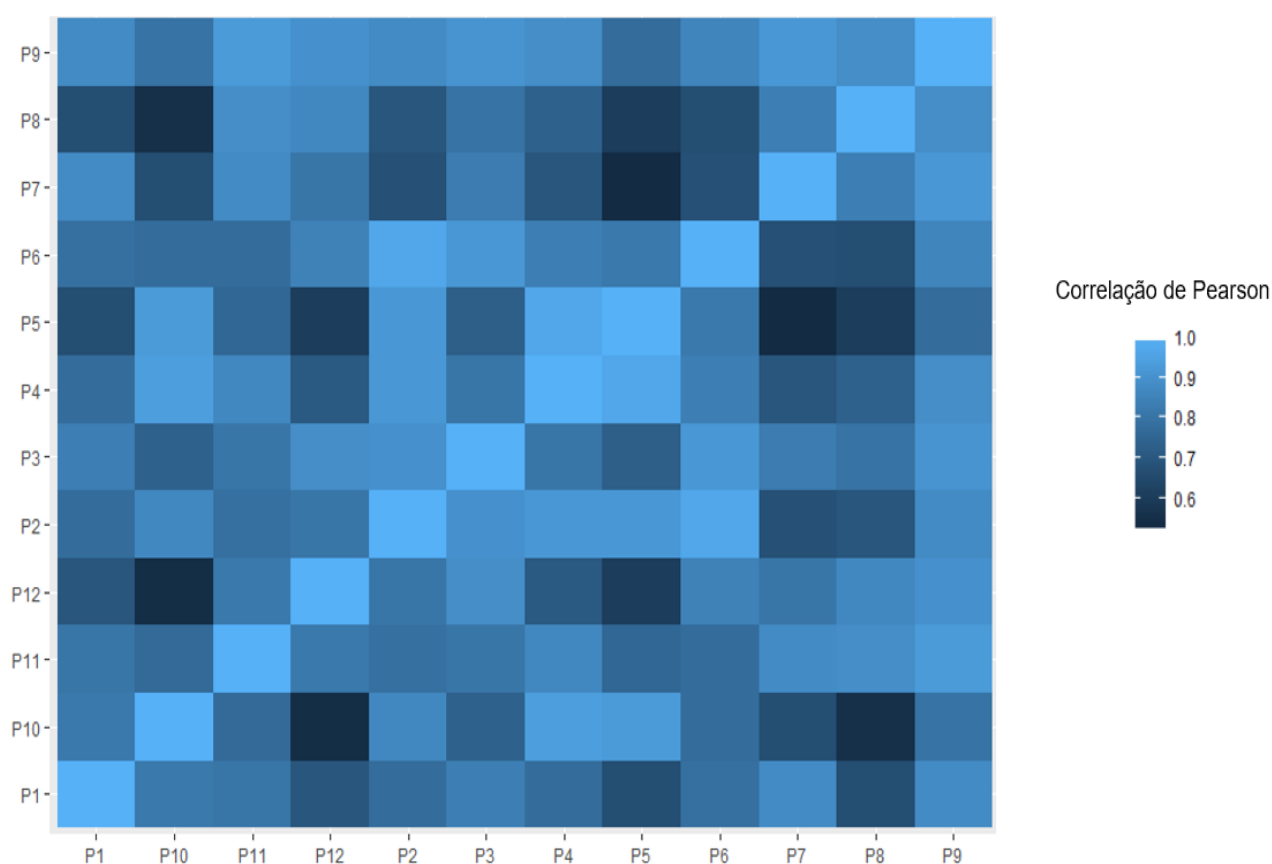


**Figura 28** - Identificação de peptídeos de domínio extracelular correspondentes a proteínas de membrana.

## 4.8 Análise proteômica das amostras de pacientes

### 4.8.1 Identificações proteicas e correlação entre as análises

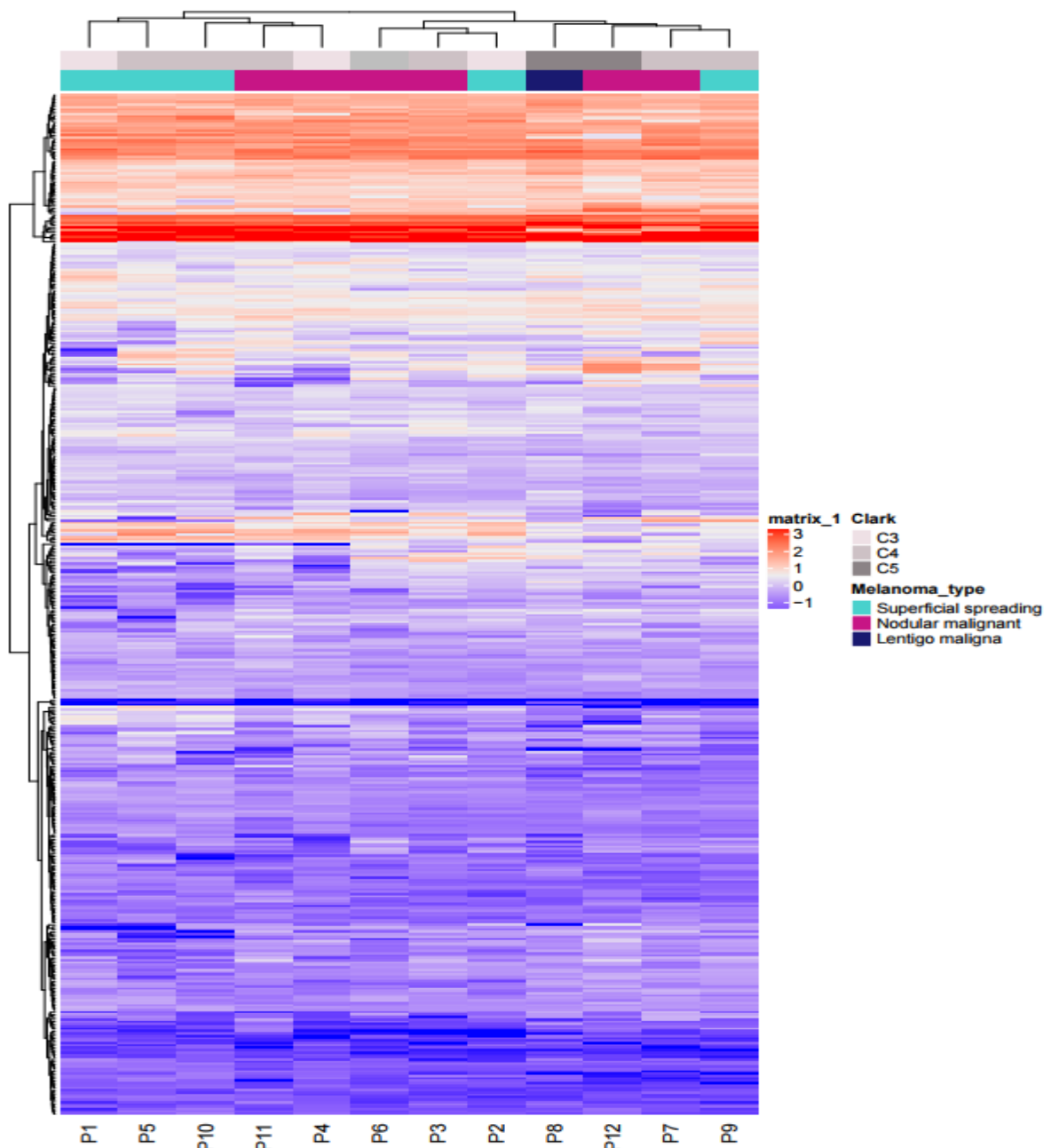
A análise das proteínas identificadas nas 12 amostras de pacientes permitiu a identificação de 2.517 proteínas, sendo 432 proteínas comuns entre todos os pacientes. A correlação entre os valores de quantificação (*LFQ intensities*) para as 12 amostras (P1 a P12) foi avaliada por meio do coeficiente de correlação de Pearson, apresentando correlação variando entre 0,61 e 1, conforme apresentado na figura 29.



**Figura 29** – Reprodutibilidade da quantificação proteica entre as amostras de pacientes.

#### 4.8.2 Análise da expressão de proteínas

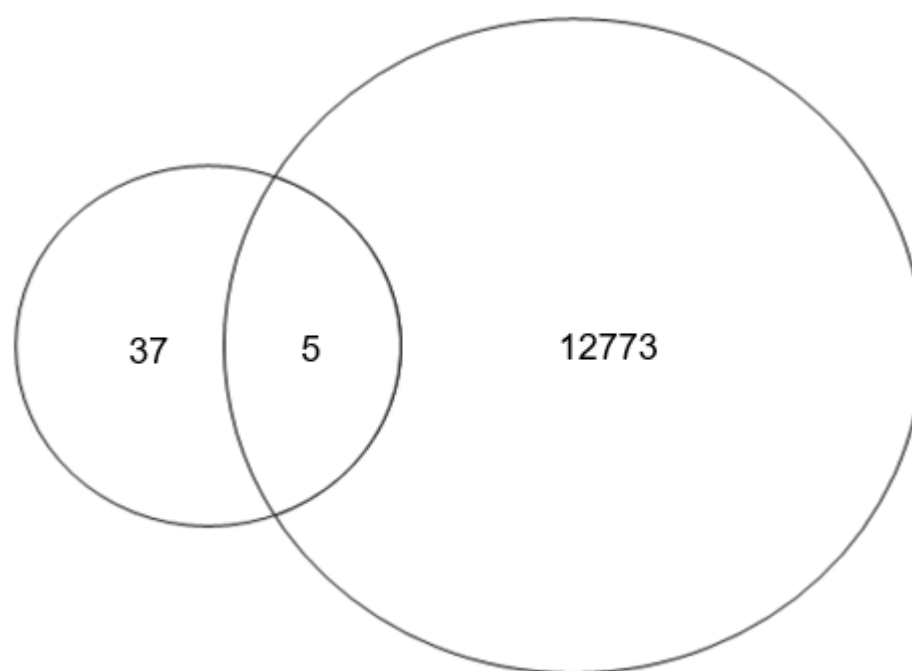
Os valores de expressão das 432 proteínas presentes das amostras dos 12 pacientes foram logaritizados ( $\log_2$ ) e agrupados em 2 grupos principais, conforme apresentado na Figura 30. Não foi possível detectar padrões específicos para o estadiamento da doença (classificação de Clark), nem referentes ao tipo de melanoma.



**Figura 30** – *Heatmap* mostrando valores de expressão normalizados para proteínas indentificadas nas amostras dos 12 pacientes com melanoma expressas. Os dados de cada amostra estão relacionados na tabela 11.

### 4.8.3 Peptídeos comuns entre todas as células tumorais

A análise de peptídeos resultantes das amostras dos 12 pacientes e 3 das linhagens tumorais humanas (Hs 895T, A375, SH4), revelou 5 peptídeos presentes em todas as amostras (Figura 31).



**Figura 31** - Análise comparativa dos peptídeos comuns identificadas nas linhagens tumorais humanas (A375, SH4 e Hs 895 T, após o procedimento TAILS e análise shotgun (Digestão Semi-tríptica) das amostras dos 12 pacientes.

Os peptídeos presentes em todas as amostras tumorais estão apresentados na tabela 11, a seguir.

**Tabela 11** - Peptídeos Identificados em todas as amostras tumorais (12 Pacientes e linhagens Hs. 895T, A375, SH4)

Número de acesso (SwissProt)	Peptídeo	Proteína
P04083	KGTDVNVFNTILTTR	Annexin A1
P24821	AVDIPGLEAATPYR	Tenascin
Q08380	ELSEALGQIFDSQR	Galectin-3-binding protein
P02768	KVPQVSTPTLVEVSR	Serum albumin
Q02818	LVTLEEFLASTQR	Nucleobindin-1

A identificação do peptídeo, KVPQVSTPTLVEVSR, correspondente à Albumina, provavelmente foi resultado de contaminação da amostra com Soro Fetal



Bovino, que mesmo após procedimento de remoção descrito, não foi efetiva em sua totalidade.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos secretomas das diferentes linhagens tumorais

As proteínas secretadas desempenham um papel crucial na comunicação celular, na progressão e evolução do melanoma (117). Neste contexto, compreender os eventos que regulam a progressão do melanoma *in situ* para o melanoma invasivo são importantes áreas da pesquisa atual (39). Os recentes avanços em genômica e proteômica aumentaram a esperança de que novos biomarcadores para diagnóstico, prognóstico ou monitoramento da resposta terapêutica em breve sejam descobertos. Desta forma, proteínas secretadas por células tumorais, são fontes promissoras para a descoberta e estudo de biomarcadores (118).

Neste trabalho nós exploramos os perfis de expressão dos secretomas de diferentes linhagens celulares, o perfil proteômico de tecidos parafinizados de pacientes com melanoma em diferentes condições, modificações pós-traducionais presentes no N-terminal das proteínas secretadas, bem como eventos de processamento proteolítico, tanto em linhagens humanas como murinas. O intuito destas análises foi o de se tentar observar padrões associados a expressão proteica e, mais especificamente, ao processamento proteolítico eventualmente presente nos modelos de melanoma analisados.

A partir da curva de crescimento, parâmetros cinéticos das linhagens em estudo foram determinados, no intuito de se verificar a adequação das condições de cultura, bem como avaliar o comportamento das células carenciadas, condição necessária para evitarmos traços de proteínas do soro fetal bovino nas análises dos secretomas. Os resultados mostraram que o desenho experimental não afetou a viabilidade celular por até 48 horas de carenciamento, tempo máximo que as células permaneceram em cultura na ausência de SFB. Entretanto, foi possível observar uma diminuição da proliferação celular na ausência de SFB, característica mais expressiva para a linhagem de melanoma maligno, A-375, que diminuiu em quase 50% sua proliferação após carenciamento. As linhagens de melanoma metastático e os fibroblastos associados ao câncer exibiram tempo de dobramento inferior e maior número de

duplicações em comparação aos fibroblastos normais, característica esperada em células malignas (119).

## **5.2 Caracterização dos secretomas e assinaturas de expressão proteica**

Os secretomas das linhagens humanas e murinas foram submetidos à eletroforese e perfis distintos entre os secretomas foram observados, caracterizando a complexidade proteica individual de cada célula, bem como o resultado da natureza celular específica, melanócitos, fibroblastos e células epiteliais de efusão pleural. Os secretomas também foram avaliados quanto à atividade proteolítica, por meio da técnica de zimografia, em que foi utilizado gelatina como substrato incorporado ao gel de SDS – poliacrilamida. Nesse caso, foi possível identificar nas linhagens humanas, intensa atividade gelatinolítica na faixa entre 66 e 97 kDa, provavelmente resultado da atividade de metaloproteases de matriz, como a MMP-2 (120,121). O melanoma é caracterizado pela alta capacidade invasiva e metastática e diferentes sistemas enzimáticos proteolíticos, incluindo o sistema ativador de plasminogênio (122,123), e a família das metaloproteases - MMPs (121,124–126) desempenham papel importante na progressão do melanoma, indicando que o equilíbrio entre MMPs e seus inibidores (TIMPs) podem ser críticos na determinação desse processo. O aumento na expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 foram correlacionados com o fenótipo invasivo em diferentes estudos de degradação de matrix extracelular (117,120,127–129).

O amplo entendimento e compreensão da biologia do melanoma requer informações substanciais sobre o proteoma da doença (130). A compreensão de padrões de assinaturas de expressão é fundamental para o entendimento das vias de sinalização (possivelmente alteradas nas células tumorais) de modo a ampliar o horizonte da descoberta de novas terapias e biomarcadores para diagnóstico precoce (131). O resultado comparativo entre os secretomas das linhagens celulares, mostrou padrões diferenciais, que caracterizamos como ‘assinaturas’ da expressão de proteínas secretadas. A análise funcional dos clusters resultantes das 461 proteínas

comuns entre as replicatas das linhagens celulares humanas nos permitiu identificar nos fibroblastos dermais, importantes processos biológicos enriquecidos, como, por exemplo aqueles relacionados com o movimento celular. Enquanto que proteínas relacionadas a processos metabólicos, como o metabolismo de pequenas moléculas e nucleotídeos exibiram valores de expressão progressivamente maiores para os fibroblastos associados ao câncer e linhagens de melanoma metastático. Proteínas envolvidas no catabolismo de carboidratos apresentaram valores de expressão aumentados nas linhagens metastáticas, um provável resultado de processos que demandam maior energia, como a tradução de proteínas, também enriquecidas nas linhagens metastáticas. Esta é uma característica esperada para células tumorais, provavelmente resultante do *efeito Warburg* em células de melanoma de crescimento acelerado (119) e também corrobora com os dados derivados das curvas de crescimento dos fibroblastos associados ao câncer e das linhagens metastáticas, que apresentaram menor tempo de dobramento em comparação com os fibroblastos de pele normal. Importante ressaltar que as proteínas envolvidas em catabolismo de carboidratos são encontradas em compartimentos intracelulares e identificamos nos secretomas celulares proteínas cuja anotação biológica remetia, de fato, a processos intracelulares. É possível que estas proteínas desempenhem papéis conhecidos como *moonlighting*, que são reconhecidas por terem o potencial de existir em vários locais nas células, com funções distintas daquelas originalmente conhecidas, desempenhando várias funções, intra ou extracelular (132).

Foi possível também identificar peptídeos oriundos do processamento de proteínas de superfície celular (processo referido como *shedding*) nos secretomas analisados. Um exemplo desta situação foram os peptídeos FAGVFHVEK, TEAADLCK e ALSICFETCR, derivados da porção extracelular do receptor de ácido hialurônico (HA), proteína CD44 (nº de acesso UniProt P16070), abundantes nos secretomas dos fibroblastos associados ao câncer (Hs 895T). A proteína CD44 medeia as interações célula-célula e célula-matriz extracelular e está envolvida com a migração e progressão das células de melanoma (GASBARRI *et al.*, 2003). Neste contexto, é possível que os peptídeos identificados pertencentes ao domínio extracelular da CD44, tenham sido gerados após processamento proteolítico (*shedding*) realizado por metaloproteases, como previamente reportado por (133,134).

A análise *in silico* da rede de interações entre as proteínas diferencialmente expressas, presentes no secretoma dos fibroblastos associados ao câncer, revelou proteínas constituintes da matriz extracelular, conectadas funcionalmente nos processos de reorganização do citoesqueleto e de motilidade celular, características, comuns entre fibroblastos associados ao câncer (135). Proteínas que participam dos processos de síntese e degradação proteica, também foram enriquecidas nos secretomas dos fibroblastos tumorais, resultado provável da rápida renovação de proteínas em células de crescimento acelerado (130,136,137). No secretoma dos fibroblastos normais, encontramos proteínas com alto valor de expressão envolvidas na adesão focal e na interação com receptores da matriz extracelular.

A análise da interação entre as proteínas diferencialmente expressas na linhagem A375 mostrou o enriquecimento de processos mediados pela MMP-2, na remodelagem da matriz extracelular, característica conhecida em fenótipos tumorais agressivos (138). Este fato sugere a participação de proteases colagenolíticas como a MMP-2 e está alinhado aos resultados de atividade proteolítica em zimografia relatados anteriormente. A atividade da MMP-2 durante a fase de crescimento radial, e a interação da MMP-2 com a integrina  $\alpha\beta_3$ , foram descritas como fundamentais para a degradação de matrix e mobilidade celular (116,139). Entre as proteínas diferencialmente expressas no secretoma da linhagem SH4, proteínas lisossomais e processos de degradação de glicosaminoglicanos foram funcionalmente enriquecidas. A observação da alta expressão de glicosaminoglicanos parece ser uma característica recorrente em análise proteômica de efusões pleurais malignas (140,141). Neste contexto, a síntese e degradação de glicosaminoglicanos, como as glicoproteínas contendo heparano-sulfato, possui papel primordial na oncogênese do melanoma (142). De fato, o aumento da expressão de heparanase tem sido correlacionado com o estabelecimento e desenvolvimento de metástase em melanoma (143,144). Essas enzimas são capazes de liberar fragmentos de heparano-sulfato, bem como fatores de crescimento residentes na matrix extracelular, com papéis importantes na angiogênese e mitose (142).

## 5.3 Padrões de processamento e modificações no N-terminal

### 5.3.1 Linhagens tumorais humanas

As modificações pós-traducionais determinam a atividade da proteína, bem como a sua estabilidade, sendo fundamentais para a regulação da homeostasia celular. Entre as modificações comumente estudadas, o processamento proteolítico tem a característica de ser irreversível, separando cadeias peptídicas ou gerando versões mais curtas de proteínas com novos terminais (145).

Utilizando a técnica de marcação isotópica de aminas terminais em substratos (TAILS) foi possível identificar N-terminais associados ou não ao processamento proteolítico nos secretomas das linhagens tumorais, sendo 45 deles comuns entre todas as linhagens. Os peptídeos CTCVPPHPQTAFCNSDLVIR, SGTHCLWTDQLLQGSEKGFQSR, THCLWTDQLLQGSEKGFQSR, KLQSGTHCLWTDQLLQGSEKGFQSR derivados do inibidor de metaloproteases TIMP1, (nº de acesso UniProt - P01033) identificados nos secretomas das linhagens tumorais, pertencem a porção madura da proteína (TIMP1), resultado de processamento que possivelmente pode alterar a função original da proteína. A invasividade, característica conhecida do melanoma, tem relação direta com a atividade de MMPs, e o desequilíbrio entre as metaloproteases e seus inibidores, podem contribuir para a progressão tumoral (124). Outro peptídeo identificado (GYFPSSIVR) entre as linhagens tumorais, correspondente a proteína regulatória do crescimento derivado do melanoma (MIA) (nº de acesso UniProt – Q16674). A MIA tem sido descrita como importante fator na inibição do crescimento e proliferação de células de melanoma HTZ 19-dM (146). A identificação do peptídeo correspondente a porção madura da MIA, pode ter sido resultado do processamento da proteína, alterando a sua função inibitória original, favorecendo assim a proliferação das células tumorais de melanoma. Processamento proteolítico fora também identificado na proteína Galectin-1 (nº de acesso UniProt P09382), descrita como importante na regulação da apoptose, proliferação celular e diferenciação celular (147). A degradação da Galectin-1, pode também contribuir para a progressão das células tumorais de melanoma. Os peptídeos identificados referentes a porção madura das proteínas estruturais de matrix extracelular (Amnextrin A1, Galectin-3-binding protein e Gelsolin), podem indicar um favorecimento da migração das células tumorais,

característica da invasividade do melanoma (117). Desta forma, a identificação dos eventos proteolíticos sugere a modulação de atividades de fundamental importância para o desenvolvimento e progressão do câncer, tais como proliferação celular (decorrentes da inativação de proteínas que regulam a inibição do crescimento e apoptose), bem como invasão e metástase (decorrentes da inativação de inibidores enzimáticos e proteínas estruturais de matriz extracelular). Estes achados reforçam o papel de proteases na modulação de eventos de sinalização celular de importância no câncer, sobretudo nos modelos de melanoma estudados neste trabalho.

### **5.3.2 Padrões de processamento e modificações no N-terminal das linhagens murinas**

A partir da análise do processamento N-terminal em proteínas presentes no secretoma da linhagem Tm1, identificamos que o fator de crescimento TGF- $\beta$ 3, possui o N-terminal iniciando-se no resíduo Leu 279, no final da região do peptídeo de latência, porção responsável por manter inativo este fator de crescimento e que antecede a região de ativação que tem início no resíduo Ala 301, sugerindo um processamento distinto da forma canônica.

De maneira análoga, o TGF- $\beta$  também foi identificado no secretoma das linhagens tumorais humanas. O fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ) é secretado como um precursor latente, sendo proteliticamente ativado em homodímero de duas cadeias polipeptídicas de 12,5 kDa ligadas por uma ponte dissulfeto (148,149). Três isoformas de TGF- $\beta$  tem sido identificadas em humanos, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 (150). As isoformas de TGF- $\beta$  têm alta afinidade e seletividade por receptores, serina/tirosina quinase do tipo II (T $\beta$ RII) distribuídos na membrana, que subsequentemente ativa o receptor TGF- $\beta$  do tipo I (149). TGF- $\beta$  é conhecido como um importante regulador da progressão tumoral, bem como de vários processos biológicos, como a proliferação, angiogênese, migração, invasão e sobrevivência (151,152). Estudos têm demonstrado o papel das isoformas de TGF- $\beta$  na progressão do melanoma (153,154). A resistência à inibição do TGF- $\beta$  sem alterações específicas nas moléculas sinalizadoras, transdutoras de sinal do TGF- $\beta$ , é característica do melanoma cutâneo (153). Tang *et al.* (155), revelaram que os níveis de expressão

proteica dos fatores de crescimento, TGF-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, em amostras teciduais de melanoma são significativamente aumentados em comparação à tecidos normais, o que corrobora com a identificação do TGF- $\beta$ 3 apenas na linhagem tumoral Tm1. O melanoma produz quantidades crescentes de TGF- $\beta$  com a progressão da doença, inibindo respostas imunes, pela diminuição da migração de células T, proporcionando o microambiente ideal para o crescimento do tumor (153,156). Assim, é possível que a forma processada que identificamos para o TGF- $\beta$ 3, gere uma proteoforma estruturalmente ativa, com capacidade de ampliar a invasividade de células tumorais, quanto ao processo de progressão tumoral. Contudo, estudos adicionais são necessários para se verificar se esta forma diferencialmente processada é funcional.

Identificamos no secretoma da linhagem tumoral Tm1, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-17), processado na região madura da proteína, sugerindo um possível processamento diferenciado em melanoma. De fato, outros autores reportaram o aumento da expressão de FGF em tumores, incluindo melanoma, o que poderia corroborar com a identificação do FGF-17 apenas na linhagem Tm1 (157,158). O processamento N-terminal do FGF-17, iniciando no resíduo Asp 39, na região madura da proteína, pode indicar uma possível ativação distinta, bem como a inativação do FGF-17 na amostra analisada. Outro fator de crescimento identificado com processamento na região madura da proteína, a granulina-2, foi anteriormente descrita como importante fator na progressão de tumores pancreáticos (141). O processamento dos fatores de crescimento identificados, em regiões desconhecidas, pode ampliar as variações e a funcionalidade dessas moléculas, o que pode contribuir para estruturas proteicas estáveis e funcionais necessárias à progressão do tumor e invasividade, processos conhecidos da malignidade do melanoma.

Além dos fatores de crescimento discutidos anteriormente, a análise do processamento do secretoma da linhagem tumoral (Tm1) revelou a clivagem de proteínas extracelulares importantes na composição da matriz extracelular. A capacidade migratória de melanócitos malignos pode estar relacionada a capacidade de degradação de proteínas estruturais (Colágenos), que facilitaria a progressão do tumor primário, bem como a dispersão de células tumorais em processos metastáticos. Nas linhagens tumorais humanas, identificamos nos secretomas, a



degradação de inibidores de metaloproteases (TIMPs) e o aumento da expressão de possíveis MMPs que também contribuem para a progressão tumoral. As assinaturas de expressão proteica diferenciais em processos patológicos, podem contribuir sinergicamente para a evolução da doença. Nesse caso, a degradação de colágeno, o aumento da expressão de metaloproteases e a degradação de inibidores de metaloproteases, identificados nas linhagens tumorais deste estudo, podem ilustrar o dinamismo das células tumorais em desenvolver mecanismos de progressão tumoral, característica comum dos melanócitos malignos. Porém, a complexidade da capacidade invasiva de tumores não se restringe a proteínas estruturais. O *shedding* de domínios ectópicos, em posições desconhecidas, como no caso da clivagem de CD166 e CD109, podem exemplificar a perda da infiltração, ou migração de células T, envolvidas na supressão de tumores (156). Segundo Hashimoto *et al.* (159) a expressão de CD109 é comumente aumentada em carcinomas pulmonares, esofágicos e gástricos, porém, a inativação de CD109 pode estimular positivamente a sinalização por TGFB, uma vez que o CD109 é um modulador negativo do TGFB.

As variações N-terminais observadas nesse estudo, nos mostram a complexidade existente, quanto ao processamento de proteínas importantes, relacionadas a processos celulares fundamentais, tanto para a manutenção da normalidade, quanto a progressão de tumores invasivos, como o melanoma.

#### **5.4 Padrões de expressão proteica nas amostras de pacientes**

*Processamento secretoma* - Os peptídeos identificados nos secretomas das linhagens tumorais, vistos e entendidos como possíveis marcadores de processos biológicos tumorais, podem ser considerados como potenciais candidatos a marcadores de diagnóstico maligno, quando encontrados em amostras de pacientes com melanoma. Nesse sentido, a análise do perfil de expressão proteica em amostras de 12 pacientes, com diferentes características fisiopatológicas, estádios distintos do tumor, bem como características intrínsecas, exclusivas da própria variabilidade de cada paciente, revelou 4 peptídeos N-terminais exclusivos, presentes em todos os pacientes, bem como nas linhagens tumorais, determinadas em laboratório. Esses

processos conservados, podem ser indicativos importantes e relevantes, na tentativa de estabelecer ou sugerir, possíveis alvos factíveis de diagnóstico, que contribuiriam para a identificação precoce da doença, bem como o acompanhamento do prognóstico dos pacientes com melanoma. Dentre as proteínas correspondentes aos peptídeos identificados, a Annexin A1, está associada com câncer, sendo superexpressa no melanoma, contribuindo para o processo metastático (160). Segundo Boudhraa *et al.* (160), a Annexin A1 é externalizada em células A375 e clivada entre resíduos de Ser (28) e Lys (29), por serina protease de membrana. Nosso estudo revelou a Annexin A1 clivada na posição 214, com resíduo de Lys na P1', região interna da proteína. Outra proteína processada em todas as amostras tumorais, a Tenascin, glicoproteína multifuncional, é altamente expressa na maioria das linhagens celulares de melanoma e têm importante papel na progressão do tumor (161).

Por outro lado, os resultados de expressão proteica nas amostras de proteínas diferencialmente expressas nos 12 pacientes analisados, não permitiu distinguir padrões específicos quanto a classificação numérica de Clark, que indica maior ou menor agressividade (97), ou quanto ao tipo de melanoma. É importante ressaltar que estes dados servirão de base para estudos subsequentes realizados em nosso laboratório, bem como estão em fase de análise adicional no intuito de se relacionar os resultados obtidos com dados de projetos em andamento.

## 6 CONCLUSÕES

- Nossa abordagem proteômica qualitativa e quantitativa permitiu a identificação de assinaturas de expressão proteica nos secretomas de linhagens de melanoma e fibroblastos associados ao câncer, bem como em amostras de pacientes com melanoma.
- Agrupamentos de perfis de expressão em conjunto com o enriquecimento funcional revelaram padrões que refletiam cada tipo celular. Esses padrões podem ser o resultado de programas específicos de expressão nos secretomas que podem servir como base para a interrogação de secretomas de outras linhagens de melanoma, bem como amostras biológicas de pacientes.
- O envolvimento das proteínas identificadas/quantificadas na oncogênese do melanoma devem ser mais explorados para correlacionar as assinaturas de expressão com marcadores de prognósticos da agressividade do melanoma.
- O processamento de proteínas que desempenham importantes papéis biológicos em diferentes processos celulares, revelou a variabilidade biológica existente tanto nos secretomas quanto nas amostras de pacientes com melanoma. Ainda assim, identificamos padrões compartilhados em diferentes contextos amostrais.
- Os peptídeos comuns entre todas as amostras tumorais podem ser investigados futuramente, em escalonamento experimental, sendo possíveis candidatos a marcadores biológicos que podem contribuir para diagnóstico e acompanhamento da evolução do melanoma.

## REFERENCIAS

1. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*. 2005;115(4):813–24.
2. Aetiology S, Brody H, Owens B, Owens B. Outlook. *Nat Outlook*. 2014;515:S109.
3. Holmes D. The cancer that rises with the sun. *Nature*. 2014;515(7527):S110–1.
4. Bartholomew M. The Integumentary System Integumentary Structure / Function Integumentary System Components • Cutaneous membrane. *Essentials Anat Physiol*. 2007;4th Edition.
5. Unicamp. Neupatimagem - Unicamp [Internet]. 2017. Available from: <http://anatpat.unicamp.br/nptmielomen1c.html>
6. Castanet J, Ortonne J. Pigmentary Changes in Aged and Photoaged Skin. *JAMA Dermatology*. 1997;133(10):1203–330.
7. Hicks M., Flaitz C. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology*. 2000;36(2):152–69.
8. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28–44.
9. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017. *Genes Dev* [Internet]. 2017;21(20):2525–38. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
10. Howe H., Wingo P., Thun M., Ries L., Rosenberg H., Feigal E., et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(11):824–42.
11. Silva IIN do CJAG da. Tipos de câncer: pele melanoma. [Internet].

- <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecan>. 2017 [cited 2017 Jun 28].  
p. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecan>. Available from:  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecan>
12. Yao K, Balch G, Winchester DJ. Multidisciplinary Treatment of Primary Melanoma. *Surg Clin North Am*. 2009;89(1):267–81.
  13. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970;172(5):902–8.
  14. Dimatos D, Duarte F, Machado R, Vieira V, Vasconcellos Z, Bins-Ely J, et al. Melanoma Cutâneo No Brasil. *Arq Catarinenses Med*. 2009;38(1):14–9.
  15. Li H, Tang Z, Zhu H, Ge H, Cui S, Jiang W. Proteomic study of benign and malignant pleural effusion. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(6):1191–200.
  16. Kivelä T, Kujala E. Prognostication in eye cancer: the latest tumor, node, metastasis classification and beyond. *Eye*. 2013;27(2):243–52.
  17. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye* [Internet]. 2013;27(2):230–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2012.255>
  18. Matthew G. Field and J. William Harbour. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014;25(3):234–9.
  19. Akabane H, Sullivan R. The Future of Molecular Analysis in Melanoma: Diagnostics to Directs to Direct Molecularly Targeted Therapy. *Am J Clin Dermatol*. 2016;17(1):1–10.
  20. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: From mutations to medicine. *Genes Dev*. 2012;26(11):1131–55.
  21. McArthur G, Ribas A. Targeting oncogenic drivers and the immune system in melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(4):499–506.
  22. Evans MS. Impact of Genetic Targets on Cancer Therapy. *Natl Inst Heal* [Internet]. 2013;779(c):1–30. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-6176-0>

23. Heijne G von. Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol.* 1990;2(4):604–8.
24. Nombela C, Gil C, Chaffin WL. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 2006;14(1):15–21.
25. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* promastigotes. *J Proteomics.* 2009;73(1):79–92.
26. Chaves DFS, Souza EM, Monteiro RA, Pedrosa F de O. A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J Proteomics.* 2009;73(1):50–6.
27. Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol.* 2010;4(6):496–510.
28. Lin Q, Tan HT, Lim HS, Chung MC. Sieving through the cancer secretome. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1834(11):2360–71.
29. Paltridge J, Khew-Goodall Y. The secretome in cancer progression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1834(11):2233–41.
30. Hanash S, Taguchi A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(9):652–60.
31. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature.* 2011;469(7329):156–7.
32. DeVita VT, Rosenberg SA. Two Hundred Years of Cancer Research. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;366(23):2207–14. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMr1204479>
33. Harmsma M, Schutte B, Ramaekers F. Serum markers in small cell lung cancer: Opportunities for improvement. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1836(2):255–72.
34. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000;100(1):57–70. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>

35. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: regulators of the Tumor Microenvironment. 2010;141(1):52–67.
36. Villarreal L, Méndez O, Salvans C, Gregori J, Baselga J, Villanueva J. Unconventional Secretion is a Major Contributor of Cancer Cell Line Secretomes. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013;12(5):1046–60. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.021618>
37. Pardo M, García Á, Antrobus R, Blanco MJ, Dwek RA, Zitzmann N. Biomarker Discovery from Uveal Melanoma Secretomes: Identification of gp100 and Cathepsin D in Patient Serum. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2802–11.
38. J BBDJH-KCD. CUTANEOUS MELANOMA Etiology and Therapy [Internet]. First Edit. Ward WH, Farma JM, editors. Philadelphia: Codon Publications; 2017. 39-57 p. Available from: [https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1mf9loahx01d8.han.mh-hannover.de/books/NBK481860/pdf/Bookshelf\\_NBK481860.pdf](https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1mf9loahx01d8.han.mh-hannover.de/books/NBK481860/pdf/Bookshelf_NBK481860.pdf)
39. Dowling P, Moran B, McAuley E, Meleady P, Henry M, Clynes M, et al. Quantitative label-free mass spectrometry analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue representing the invasive cutaneous malignant melanoma proteome. *Oncol Lett*. 2016;12(5):3296–304.
40. Abbas O, Miller D, Bhawan J. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *American J Dermatopathol*. 2014;36(5):363–79.
41. Lai ZW, Weisser J, Nilse L, Costa F, Keller E, Tholen M, et al. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues (FFPE) as a Robust Source for the Profiling of Native and Protease-Generated Protein Amino Termini. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2016;15(6):2203–13. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.O115.056515>
42. Hegde R, Bernstein H. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(10):563–71.

43. Meinnel T, Serero A, Giglione C. Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol Chem*. 2006;387(7):839–51.
44. Kleifeld O, Doucet A, Prudova A, auf dem Keller U, Goia M, Kizhakkedathu J, et al. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat Protoc*. 2011;6(10):1578–611.
45. Rogers LD, Overall CM. Proteolytic Post-translational Modification of Proteins: Proteomic Tools and Methodology. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013;12(12):3532–42. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M113.031310>
46. López-Otín C, Overall C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev*. 2002;3(7):509–19.
47. Tooley JG, Schaner Tooley CE. New roles for old modifications: Emerging roles of N-terminal post-translational modifications in development and disease. *Protein Sci*. 2014;23(12):1641–9.
48. Drew SC, Masters CL, Barnham KJ. Alzheimer's A $\beta$  peptides with disease-associated NTerminal modifications: Influence of isomerisation, truncation and mutation on Cu<sup>2+</sup> coordination. *PLoS One*. 2010;5(12).
49. Marino G, Eckhard U, Overall CM. Protein Termini and Their Modifications Revealed by Positional Proteomics. *ACS Chem Biol*. 2015;10(8):1754–64.
50. Arfin S, Bradshaw R. Cotranslational processing and protei turnover in eukaryotic cells. *Biochemistry*. 1998;18(21):7979–84.
51. Forte GMA, Pool MR, Stirling CJ. N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biol*. 2011;9(5).
52. Kalvik T V., Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases in cancer. *Oncogene* [Internet]. 2013;32(3):269–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.82>
53. Alan FR, Wang K, Evjenth R, Jinchuan Xing, Johnston JJ, Swensen JJ, et al. Using VAAST to identify an X-linked disorder resulting in lethality in male infants due to N-terminal acetyltransferase deficiency. *Am J Hum Genet* [Internet].



- 2011;89(1):28–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.017>
54. Helbig AO, Gauci S, Raijmakers R, van Breukelen B, Slijper M, Mohammed S, et al. Profiling of *N*-Acetylated Protein Termini Provides In-depth Insights into the N-terminal Nature of the Proteome. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2010;9(5):928–39. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M900463-MCP200>
  55. Kumar A, Bachhawat AK. Pyroglutamic acid: Throwing light on a lightly studied metabolite. *Curr Sci*. 2012;102(2):288–97.
  56. Shih YP, Chou CC, Chen YL, Huang KF, Wang AHJ. Linked production of pyroglutamate-modified proteins via self-cleavage of fusion tags with TEV protease and autonomous N-terminal cyclization with glutaminyl cyclase in Vivo. *PLoS One*. 2014;9(4).
  57. Wirths O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, et al. Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm*. 2010;117(1):85–96.
  58. Cynis H, Kehlen A, Haegele M, Hoffmann T, Heiser U, Fujii M, et al. Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(3):217–25.
  59. Kehlen A, Haegele M, Menge K, Gans K, Immel UD, Hoang-Vu C, et al. Role of glutaminyl cyclases in thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(1):79–90.
  60. Wiśniewski JR, Zougman A, Mann M. N $\epsilon$ -Formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(2):570–7.
  61. Jiang T, Zhou X, Taghizadeh K, Dong M, Dedon PC. N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007;104(1):60–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606775103>
  62. Okanishi H, Kim K, Masui R, Kuramitsu S. Lysine Propionylation Is a Prevalent

- Post-translational Modification in *Thermus thermophilus*. Mol Cell Proteomics [Internet]. 2014;13(9):2382–98. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M113.035659>
63. Sum M, Xu J, Wu Z, Zhai L, Liu C, Cheng Z, et al. Characterization of Protein Lysine Propionylation in Escherichia coli: Global Profiling, Dynamic Change, and Enzymatic Regulation. J Proteome Res. 2016;15(12):4696–708.
  64. Dormeyer W, Mohammed S, Breukelen B, Heck A. Targeted analysis of protein termini. J Proteome Res. 2007;6(12):1634–45.
  65. Zhang X, Ye J, Hojrup P. A proteomics approach to study in vivo protein N(alpha)-modifications. J Proteomics. 2009;73(2):240–51.
  66. Foyen H, Van Damme P, Støve SI, Glomnes N, Evjenth R, Gevaert K, et al. Protein N-terminal Acetyltransferases Act as N-terminal Propionyltransferases *In Vitro* and *In Vivo*. Mol Cell Proteomics [Internet]. 2013;12(1):42–54. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.019299>
  67. Nie L, Shuai L, Zhu M, Liu P, Xie Z, Jiang S, et al. The Landscape of Histone Modifications in a High-Fat Diet-Induced Obese (DIO) Mouse Model. Mol Cell Proteomics. 2017;16(7):1324–34.
  68. Boutin J. Myristoylation. Cell Signal. 1997;9(1):15–35.
  69. Wright MH, Heal WP, Mann DJ, Tate EW. Protein myristoylation in health and disease. J Chem Biol. 2010;3(1):19–35.
  70. Thinon E, Serwa RA, Broncel M, Brannigan JA, Brassat U, Wright MH, et al. Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. Nat Commun [Internet]. 2014;5:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5919>
  71. Frearson JA, Brand S, Mcelroy SP, Cleghorn LAT, Stojanovski L, Price HP, et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts N - Myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. 2010;464(7289):728–32.
  72. Felsted R, Glover C, Hartman K. Protein N-myristoylation as a chemotherapeutic

- target for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(21):1571–3.
73. Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Shrivastav A, Das S, Dimmock J, Sharma R. Potential role of N-myristoyltransferase in cancer. *Prog Lipid Res.* 2007;46(1):1–36.
  74. Anderson AM, Ragan MA. Palmitoylation: a protein S-acylation with implications for breast cancer. *npj Breast Cancer* [Internet]. 2016;2(1):16028. Available from: <http://www.nature.com/articles/npjbcancer201628>
  75. Lemonidis K, Sanchez-Perez MC, Chamberlain LH. Identification of a novel sequence motif recognized by the ankyrin repeat domain of zDHHC17/13 S-acyltransferases. *J Biol Chem.* 2015;290(36):21939–50.
  76. Liu Z, Yang T, Li X, Peng T, Hang HC, Li XD. Integrative chemical biology approaches for identification and characterization of “erasers” for fatty-acid-acylated lysine residues within proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet]. 2015;54(4):1149–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4382910&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
  77. Zeidman R, Jackson C, Magee A. Protein acyl thioesterases. *Mol Membr Biol.* 2009;26(1):32–41.
  78. Kaniskan HÜ, Jin J. Chemical probes of histone lysine methyltransferases. *ACS Chem Biol.* 2015;10(1):40–50.
  79. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell.* 2007;128(4):802.
  80. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev.* 2005;6(11):839–49.
  81. Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* (80- ). 1986;234(4773):179–86.
  82. Lai Z, Petrera A, Schilling O. Protein amino-terminal modifications and proteomic approaches for N-terminal profiling. *Curr Opin Chem Biol.* 2015;24(7):1–9.
  83. Sriram S, Kim B, Kwon Y. The N-end rule pathway: emerging functions and

- molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev.* 2011;12(11):735–47.
84. Puente X, Sanchez L, Overall C, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev.* 2003;4(7):544–58.
  85. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: The cutting edge. *EMBO J.* 2012;31(7):1630–43.
  86. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* [Internet]. 2002;420(6917):860–7. Available from: <http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-0037180757&origin=inward&txGid=nrzriWhg2oR6fypyvyqK169:76>
  87. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
  88. Butler G, Overall C. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new “intracellular” substrates revealed by degradomics. *Biochemistry.* 2009;48(46):10830–45.
  89. Rodriguez D, Morrison C, Overall C. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(1):39–54.
  90. Lange PF, Overall CM. Protein TAILS: when termini tell tales of proteolysis and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;17(1):73–82.
  91. Huesgen P, Lange P, Overall C. Ensembles of protein termini and specific proteolytic signatures as candidate biomarkers of disease. *Proteomics Clin Appl.* 2014;8(5–6):338–50.
  92. Laurent-Matha V, Huesgen PF, Masson O, Derocq D, Prébois C, Gary-Bobo M, et al. Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment. *FASEB J.* 2012;26(12):5172–81.
  93. Chang J, Kang U, Kim D, Yi J, Lee J, Noh D, et al. Identification of circulating endorepellin LG3 fragment: Potential use as a serological biomarker for breast cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2(1):23–32.

94. Schilling O, Keller U auf dem, Overall CM. Factor Xa subsite mapping by proteome-derived peptide libraries improved using WebPICS, a resource for proteomic identification of cleavage sites. *Biol Chem.* 2011;392(11):1031–7.
95. Impens F, Colaert N, Helsens K, Plasman K, Van Damme P, Vandekerckhove J, et al. MS-driven protease substrate degradomics. *Proteomics.* 2010;10(6):1284–96.
96. Mahrus S, Trinidad JC, Barkan DT, Sali A, L A, Wells JA. NIH Public Access. 2009;134(5):866–76.
97. Clark WH, From L, Bernardino E a, Clark H, Bernardino E, Mihm MC. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin The Histogenesis Malignant Behavior of Primary Melanomas of the Skin1. *Cancer Res.* 1969;(March):705–27.
98. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* 2010. 595-602 p.
99. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc.* 2015;111(1):A3.B.1-A3.B.3.
100. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;7(72):248–54.
101. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
102. Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Gorg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight analysis. *Proteomics.* 2001;1(11):1359–63.
103. Heussen C, Dowdle E. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 1980;102(1):196–202.
104. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using Stage Tips. *Nat*

Protoc. 2007;2(8):1896–906.

105. Boersema P., Rajimakers R, Lemmer S, Mohammed S, Heck A. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc.* 2009;4(4):484–94.
106. Elias J, Gygi S. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007;4(3):207–14.
107. Keller A, Eng J, Zhang N, Li X, Aebersold R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2005;1(1):E1–8. Available from: <http://msb.embopress.org/cgi/doi/10.1038/msb4100024>
108. Eng J, Jahan T, Hoopmann M. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics.* 2013;13(1):22–4.
109. Fortelny N, Yang S, Pavlidis P, Lange PF, Overall CM. Proteome TopFIND 3.0 with TopFINDER and PathFINDER: Database and analysis tools for the association of protein termini to pre- and post-translational events. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D290–7.
110. Sturm M, Bertsch A, Gröpl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E, et al. OpenMS - An open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:1–11.
111. Kim S, Gupta N, Pevzner PA. [journal of proteome] pevzner kim Spectral Probabilities and Generating Functions of Tandem Mass Spectra a Strike Against the Decoy Database-supplement-Supplementary\_Info. *Natl Inst Heal.* 2008;7(8):1–6.
112. Nilse L, Sigloch FC, Biniossek M, Schilling O. Toward improved peptide feature detection in quantitative proteomics using stable isotope labeling. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9(7–8):706–14.
113. Gentleman RC, others. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2010 11202.

2004;5(10):R80.

114. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 2005;21(18):3674–6.
115. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D362–8.
116. Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol*. 2014;93(1–2):23–9.
117. MacDougall J, Matrisian L. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1995;14(4):351–62.
118. Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers? *J Proteomics* [Internet]. 2010;73(10):1896–906. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.04.003>
119. Scott DA, Richardson AD, Filipp F V., Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: Beyond the Warburg effect. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42626–34.
120. Macdougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kDa Gelatinase-B Is Expressed by Advanced-Stage Melanoma- Cells - Suppression by Somatic-Cell Hybridization with Early- Stage Melanoma-Cells. *Cancer Res*. 1995;Vol 55(Iss 18):4174–81.
121. Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Expression of Integrin  $\alpha_5\beta_1$  3 Correlates With Activation of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-1 ( Mt1-Mmp ) and Matrix Metalloproteinase-2 ( Mmp-2 ) in Human Melanoma Cells. *Int J Cancer*. 2004;19(November 1999):12–9.
122. de Vries T, van Muijen G, Ruiter D. The plasminogen activation system in melanoma cell lines and in melanocytic lesions. *Melanoma Res*. 1996;6(2):79–88.

123. Ferrier C., van Muijen G., Ruiter D. Proteases in cutaneous melanoma. *Ann Med.* 1998;30(5):431–42.
124. van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, de Wolf-Peeters C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* [Internet]. 1997;151(3):665–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1857847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
125. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol.* 1998;186(1):51–8.
126. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, et al. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer.* 1999;80(5–6):733–43.
127. Langley KE, Reisfeld RA, Mueller BM. Melanoma-mediated Dissolution of Extracellular Matrix: Contribution of Urokinase-dependent and Metalloproteinase-dependent Proteolytic Pathways. *Cancer Res.* 1993;53(3):693–700.
128. Mueller B. Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;213(1):65–80.
129. Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 1997;1356(3):271–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488997000049>
130. Hedhli N, Pelat M, Depre C. Protein turnover in cardiac cell growth and survival. *Cardiovasc Res.* 2005;68(2):186–96.
131. Caccia D, Zanetti Domingues L, Micciche F, De Bortoli M, Carniti C, Mondellini P, et al. Secretome compartment is a valuable source of biomarkers for cancer-relevant pathways. *J Proteome Res.* 2011;10(9):4196–207.



132. Min K-W, Lee S-H, Baek SJ. Moonlighting proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2016;370(1):108–16.
133. Gasbarri A, Del Prete F, Girnita L, Martegani MP, Natali PG, Bartolazzi A. CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage. *Melanoma Res.* 2003;13(4):325–37.
134. Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp.* 2003;70:253–62.
135. Madar S, Goldstein I, Rotter V. Cancer associated fibroblasts - more than meets the eye. *Trends Mol Med.* 2013;19(8):447–53.
136. Carmichael MJ, Clague M., Keir M., Johnston ID. Whole body protein turnover, synthesis and breakdown in patients with colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 2005;67(10):736–9.
137. Cheong JK, Hsu SI. Human Diseases. *J Cancer Res.* 2013;2013:11.
138. Giard DJ, Aaronson S., Todaro G., Arnstein P, Kersey J., Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417–23.
139. Brooks PC, Strömblad S, Sanders L, Vonschalscha TL, Amies RT, Ouigley TP, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the cell surface by interaction with integral  $\alpha\beta 3$ . *FASEB J.* 1996;10(6):683–93.
140. Cappellesso R, Million R, Arrigoni G, Simonato F, Caroccia B, Iori E, et al. Lumican is overexpressed in lung adenocarcinoma pleural effusions. *PLoS One.* 2015;10(5):1–13.
141. Nielsen SR, Quaranta V, Linford A, Emeagi P, Rainer C, Santos A, et al. Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol.* 2016;18(5):549–60.
142. Nikitovic D, Mytilinaiou M, Berdiaki A, Karamanos N., Tzanakanis G. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1840(8):2471–81.

143. Roy M, Reiland J, Murry BP, Chouljenko V, Kousoulas KG, Marchetti D. Antisense-Mediated Suppression of Heparanase Gene Inhibits Melanoma Cell Invasion. *Neoplasia* [Internet]. 2005;7(3):253–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558605800260>
144. Wang X, Wen W, Wu H, Chen Y, Ren G, Guo W. Heparanase expression correlates with poor survival in oral mucosal melanoma. *Med Oncol*. 2013;30(3):633.
145. Lange PF, Huesgen PF, Overall CM. TopFIND 2.0 - Linking protein termini with proteolytic processing and modifications altering protein function. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1):351–61.
146. Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J, et al. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res*. 1989;49(19):5358–63.
147. He J, Baum LG. Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4705–12.
148. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(3):169–78.
149. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-B family signalling. *Nature*. 2003;425:577–84.
150. Wu MY, Hill CS. TGF- $\beta$  Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. *Dev Cell* [Internet]. 2009;16(3):329–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.012>
151. Leivonen S-K, Kähäri V-M. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer* [Internet]. 2007;121(10):2119–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23113>
152. Massagué J. TGFb in cancer. *Cell* [Internet]. 2008;134(2):215–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
153. Busse A, Keiholz U. Role of TGF-B in Melanoma. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(12).

154. Lasfar A, Cohen-Solal KA. Resistance to transforming growth factor  $\beta$ -mediated tumor suppression in melanoma: Are multiple mechanisms in place? *Carcinogenesis*. 2010;31(10):1710–7.
155. TANG M-R, WANG Y-X, GUO S, HAN S-Y, LI H-H, JIN S-F. Prognostic significance of in situ and plasma levels of transforming growth factor  $\beta$ 1, -2 and -3 in cutaneous melanoma. *Mol Med Rep [Internet]*. 2015;11(6):4508–12. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.3250>
156. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, et al. TGFB drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018;554:538–43.
157. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP. Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am J Pathol [Internet]*. 1994;145(1):97–104. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887285&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
158. Scott G; Stoler M; Sarkar S; Halaban R. Localization of Basic Fibroblast Growth Factor mRNA in Melanocytic Lesions by In Situ Hybridization. *Soc Investig Dermatology*. 1991;5.
159. Hashimoto M, Ichihara M, Watanabe T, Kawai K, Koshikawa K, Yuasa N, et al. Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene*. 2004;23(20):16–20.
160. Boudhraa Z, Merle C, Mazzocut D, Chezal J., Chambon C, Miot-Noirault E, et al. Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma. *Arch Dermatol Res*. 2014;306(10):903–14.
161. Shao H, Kirkwood JM, Wells A. Tenascin-C signaling in melanoma. *Cell Adhes Migr*. 2015;9(1–2):125–30.

## ANEXO 1

Para o cálculo do número de dobramentos da população celular, utilizamos a seguinte fórmula, de acordo com Freshney, R.I., 2010:

$$DP = \frac{\ln(N_{final} / N_{inicial})}{\ln 2}$$

Em que DP = dobramento da população; ln = logaritmo natural; *N*<sub>final</sub> = número de células no final da fase exponencial; *N*<sub>inicial</sub> = número de células no início da fase exponencial.

O tempo de dobramento foi calculado seguindo a expressão:

$$\text{Tempo de dobramento} = \frac{(\text{duração} * \log 2)}{\log(\text{concentração final}) - \log(\text{concentração Inicial})}$$

A densidade de saturação foi obtida pelo cálculo da média entre os três valores pertencentes ao platô. Nesse momento as culturas celulares estavam confluentes em sua totalidade.

## ANEXO 2 – Curvas de Crescimento

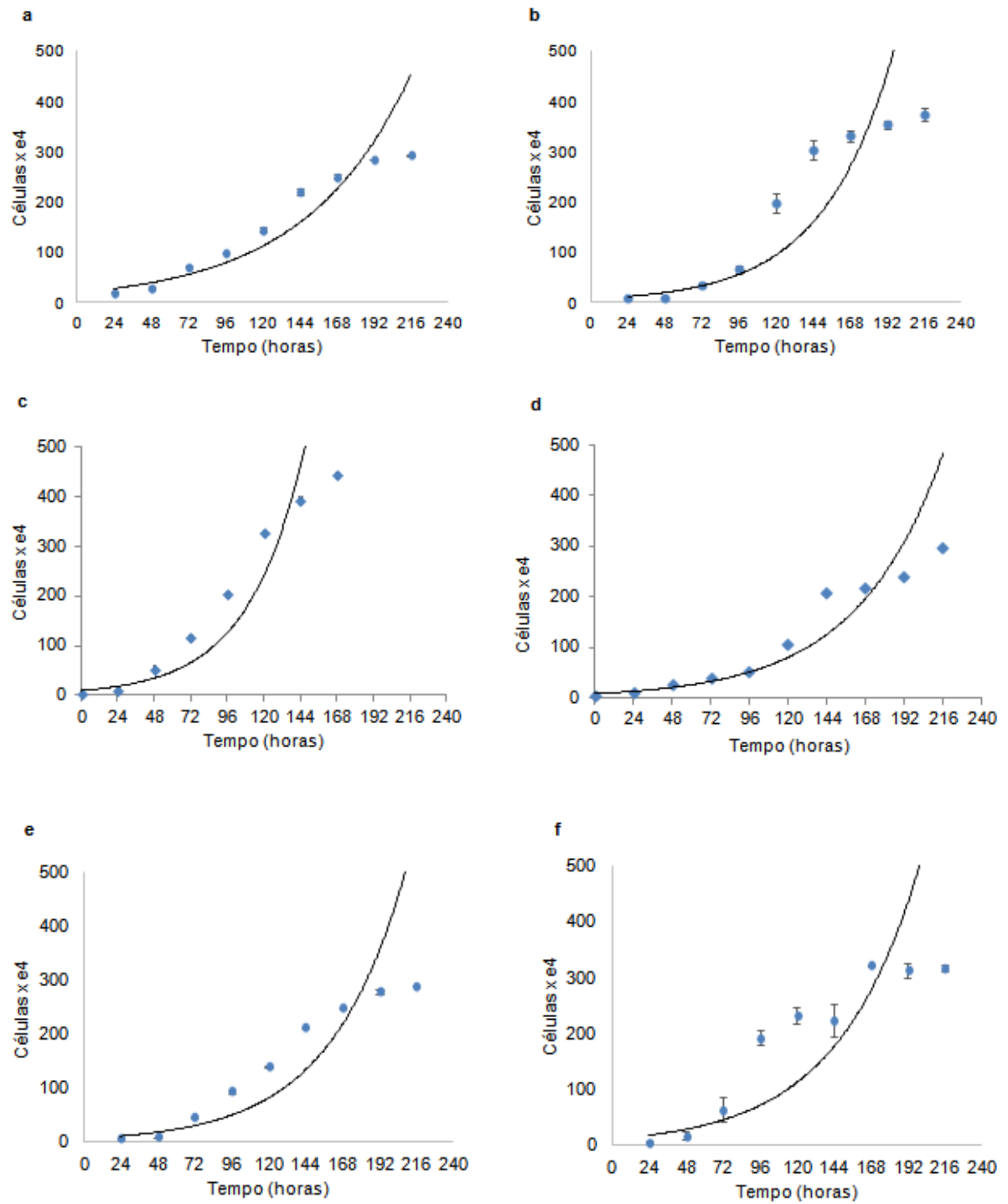


Figura 32 - Curvas de Crescimento das linhagens em estudo (a) Hs. 985 Sk (b) Hs. 895 T (c) A375 (d) SH4 (e) MelanA (f) Tm1

### **ANEXO 3 - Material suplementar**

O conteúdo descrito abaixo foi compartilhado em CD

<b>Tabelas</b>	<b>Conteúdo</b>
<b>1</b>	Anotação posicional dos dados de TAILS para as proteínas dos secretomas das linhagens murinas pareadas (Melan-a e Tm1).
<b>2</b>	Metadados das identificações das amostras teciduais de 12 pacientes com melanoma.

**ANEXO - 4 – Artigo publicado na revista *Journal of Proteomics***

## **ANEXO - 5 – Artigo submetido à publicação**